

Aus der Medizinischen Klinik m. S.  
Kardiologie, Pulmologie und Angiologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# **Interaktionen zwischen dem Peptid- hormon Relaxin und dem humanen Glukokortikoidrezeptor**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Michael Peter Greinwald  
aus Toronto/ Kanada

Gutachter:      1. Priv.-Doz. Dr. med. Th. Dschietzig  
                         2. Prof. Dr. F. Brunner  
                         3. Prof. Dr. med. S. Felix

Datum der Disputation: 15.05.2006

### Zusammenfassung

Seit Beginn des 20. Jahrhunderts ist Relaxin bekannt als Schwangerschaftshormon, das unter anderem zur pränatalen Weitung des Geburtskanals beiträgt. Erst in den letzten Jahren wurden weitere Wirkungen des Peptidhormons beschrieben. So beeinflusst Relaxin den Gefäßtonus, die Nierenfunktion sowie die Kollagenbilanz des Bindegewebes. Als Angriffsstelle des Peptidhormons wurden im Jahre 2002 zwei membranständige Rezeptoren, LGR7 und LGR8, identifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit an HeLa- und THP-1-Zellen konnte nun erstmals gezeigt werden, dass Relaxin als Agonist mit dem Glukokortikoidrezeptor interagiert.

Zunächst konnte mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen eine Bindung von Relaxin an den Rezeptor nachgewiesen werden. 30 Minuten nach Behandlung mit Relaxin kam es zu einer Translokation von Relaxin und Glukokortikoidrezeptoren in den Zellkern. Eine transiente Transfektion mit einem GRE-Luziferase-Konstrukt zeigte eine Aktivierung von *glucocorticoid response elements* (GRE) nach Inkubation mit Relaxin. Funktionell führte Relaxin zu einer verminderten TNF $\alpha$ -Sekretion von Makrophagen nach Stimulation mit bakteriellem Endotoxin. Mittels PCR, Western Blots sowie  $^3\text{H}$ -Dexamethason-Inkorporation konnte eine Zunahme funktionell aktiver Glukokortikoidrezeptoren nach Behandlung mit Relaxin gezeigt werden. Alle beschriebenen Effekte des Relaxins ließen sich durch Koinkubation mit dem Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten RU-486 aufheben.

**Abstract**

Relaxin has been known as a central hormone of pregnancy responsible for the dilatation of the birth canal since the beginning of the 20<sup>th</sup> century. Recent studies elucidated several new effects of relaxin such as regulation of vasotonus, renal function, and collagen turnover. In 2002, two G-protein-coupled receptors, LGR7 and LGR8, were identified as relaxin receptors.

The present study shows for the first time that relaxin interacts as an agonist with glucocorticoid receptors (GR) in HeLa- and THP-1-cells.

Initially, co-immunoprecipitation experiments revealed binding of relaxin to glucocorticoid receptors. Treatment with relaxin led to translocation of relaxin and glucocorticoid receptors into the nucleus within 30 minutes. After stimulation with relaxin, cells transiently transfected with GRE-luciferase constructs demonstrated activation of glucocorticoid receptors. At the functional level, relaxin reduced – in GR-dependent manner - TNF $\alpha$ -secretion of macrophages after stimulation with bacterial endotoxin. An increase of functionally active glucocorticoid receptors after incubation with relaxin was shown by PCR, western blots, and incorporation of <sup>3</sup>H-labeled dexamethasone. All investigated effects of relaxin were abolished by co-treatment with the glucocorticoid receptor antagonist RU-486.

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Relaxin	1
1.1.1	Die Entdeckung des Hormons Relaxin	1
1.1.2	Struktur	2
1.1.3	Synthese	3
1.1.4	Zirkulierende Relaxin-Spiegel	4
1.1.5	Gen-Isoformen	4
1.1.6	Signaltransduktion	5
1.1.7	Biologische Effekte	6
1.2	Glukokortikoid-Rezeptor	12
1.2.1	Sekretion der Glukokortikoide	12
1.2.2	Biologische Effekte von Glukokortikoiden	13
1.2.3	Wirkungsvermittlung über den Glukokortikoidrezeptor	14
1.2.4	Struktur des Glukokortikoidrezeptors	16
1.2.5	Regulation der zellulären Konzentration von Glukokortikoidrezeptoren	16
1.2.6	Glukokortikoidrezeptorantagonist RU-486	17
1.3	Zielsetzung der Arbeit	18
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Zellkultur	19
2.1.1	Materialien	19
2.1.2	Kulturbedingungen	20
2.1.3	Zelltypen	20
2.1.4	Zeitkinetiken	21
2.2	Protein-Nachweismethoden	21
2.2.1	Präparation von Kern-/ Zytoplasma-Extrakten	21
2.2.2	Western Blots	23
2.2.3	Immunpräzipitation	28
2.3	Gesamt-RNA-Extraktion	29

---

2.3.1	Prinzip	29
2.3.2	Protokoll	30
2.4	PCR	30
2.4.1	Materialien	30
2.4.2	Erststrang-Synthese	30
2.4.3	Prinzip der PCR	31
2.4.4	Protokoll	31
2.4.5	Analyse von PCR-Fragmenten	32
2.5	Transiente Transfektion	33
2.5.1	Prinzip	33
2.5.2	Protokoll	33
2.6	GRE-Luziferase-Messungen	34
2.6.1	Prinzip	34
2.6.2	Protokoll	35
2.7	Radioligandenbindung	35
2.7.1	Prinzip	35
2.7.2	Berechnung der Rezeptorkonzentration und der Dissoziationskonstanten	38
2.7.3	Darstellung nach Scatchardplot	40
2.7.4	Protokoll	41
2.8	Zytokin-Messungen	41
2.8.1	Durchführung	41
2.8.2	Prinzip ELISA	42
2.8.3	Zellstimulation	42
2.8.4	Stimulanzen	43
2.8.5	Materialien ELISA	43
2.8.6	Protokoll ELISA	44
2.9	Statistische Auswertung	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>

3.1	TNF $\alpha$ -Expression	46
3.2	Koimmunpräzipitation	54
3.3	Verteilung von Glukokortikoidrezeptoren und Relaxin in Zytoplasma und Zellkern	55
3.3.1	Verteilung des Glukokortikoidrezeptors	55
3.3.2	Verteilung des Relaxins	56
3.4	Bestimmung der Luziferaseaktivität als Marker für die Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors	56
3.5	Regulation des Glukokortikoid-Rezeptors durch Relaxin auf mRNA-Ebene	60
3.6	Regulation des Glukokortikoidrezeptors durch Relaxin auf Proteinebene	65
3.6.1	Steroidfreies Medium	69
3.7	Sättigungskurven von $^3\text{H}$ -Dexamethason	69
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
4.1	Hemmung der TNF $\alpha$ -Expression	73
4.2	Bindung an den Glukokortikoidrezeptor-Proteinkomplex	74
4.3	Translokation des Glukokortikoidrezeptors in den Nukleus nach Stimulation mit Relaxin	75
4.4	Bindung an die „glucocorticoid response elements“	75
4.5	Steigerung der GR-mRNA- und GR-Proteinmenge	76
4.5.1	Einleitung	76
4.5.2	Dexamethason	76
4.5.3	Relaxin	77
4.5.4	Zusammenfassung	77
4.6	Steigerung der funktionellen Rezeptorzahl in der Zelle	78
4.7	Konsequenzen und Ausblicke	78
4.7.1	Klinische Bezüge	80
4.8	Abschließende Bemerkung	81
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>

<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>100</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Relaxin

Das Peptidhormon Relaxin ist seit langem als zentrales Schwangerschaftshormon bekannt, welches vor allem perinatale Effekte wie die Weitung des Geburtskanals (Fevold et al., 1930; Graham und Dracy, 1953), Unterdrückung der muskulären Aktivität des Uterus (Krantz et al., 1950) und Wachstum und Differenzierung der Brustdrüse (Hamolsky und Sparrow, 1945) vermittelt. Lange wurde Relaxin nur als Reproduktionshormon angesehen, bis ab 1980 viele interessante neue Aspekte dieses Peptids entdeckt wurden, unter anderem seine Wirkungen auf den Gefäßtonus (St. Louis und Massicotte, 1985; Vasilenko et al., 1986; Bigazzi et al., 1986; Bani-Sacchi et al., 1995; Bani et al., 2001), die renale Funktion (Danielson et al., 1999; Novak et al., 2001) und die Kollagenbilanz des Bindegewebes (Unemori et al., 1993; Garber et al., 2001; Palejwala et al., 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Interaktionen zwischen Relaxin und Glukokortikoidrezeptoren untersucht. Einen Anstoß für diese Überlegungen gaben Befunde, die eine antiasthmatische (Bani et al., 1997), antiallergische (Masini et al., 1994) und immunmodulierende (Piccinni et al., 2000) Wirkung von Relaxin nahe legten. Hierzu zählen auch Untersuchungen, nach denen Relaxin ein wichtiger Induktor der maternalen Immuntoleranz gegenüber dem Fetus während der Schwangerschaft ist (Sunder und Lenton, 2000; Seppala et al., 2001).

### 1.1.1 Die Entdeckung des Hormons Relaxin

Im Jahre 1926 injizierte Frederick Hisaw (Hisaw, 1926) Serum trächtiger Meerschweinchen und Kaninchen in nicht-schwangere weibliche Meerschweinchen. Er stellte fest, dass sich bei den mit Serum behandelten Meerschweinchen der Symphysenspalt weitete. 1930 konnte Fevold (Fevold et al., 1930) aus Hisaws Arbeitsgruppe denselben Effekt beobachten, wenn er lediglich einen einfachen wässrigen Extrakt aus Schweinegelbkörpern verwendete. Fevold gab dem vermuteten neuen Hormon den Namen „Relaxin“.

In den folgenden Jahrzehnten konnten die Erkenntnisse über den Effekt des Relaxins in der Schwangerschaft durch Tierversuche vertieft werden. Es wurde festge-

stellt, dass Relaxin das Wachstum der Brustdrüse fördert (Hamolsky und Sparrow, 1945), die spontane Kontraktion des Myometriums hemmt (Krantz et al., 1950) und den Gebärmutterhals wachsen und weicher werden lässt (Graham und Dracy, 1953). Zusammenfassend hat Relaxin also eine geburtsvorbereitende Wirkung.

Bis in die frühen achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde hauptsächlich mit Schweinerelaxin gearbeitet, da in den Schlachthäusern große Mengen an Ovarien von schwangeren Säuen anfielen.

Durch Fortschritte in der Biotechnologie konnte Schweinerelaxin 1977 sequenziert und 1981 die cDNA kloniert werden (Sherwood, 1994). 1991 wurde die kristalline Struktur von humanem Relaxin identifiziert (Sherwood, 1994).

### 1.1.2 Struktur

Das humane Relaxin ist ein ca. 6300 Da großes, aus zwei Ketten bestehendes Peptidhormon. Es zeigt strukturelle Ähnlichkeit zum Insulin (Blundel und Humbel, 1980); wie bei diesem sind die beiden Peptidketten A und B über zwei Disulfidbrücken verbunden (siehe Abbildung 1). Zusätzlich gibt es eine ketteninterne Disulfidbrücke in der A-Kette (Schwabe et al., 1978) (siehe Abbildung 2). Wenn man Relaxine verschiedener Spezies vergleicht, sind ihre Sequenzen zu 40-70% homolog. Die Disulfidbrücken finden sich jedoch nahezu immer an den gleichen Positionen, so dass vermutet werden kann, dass alle Relaxine ähnliche Tertiärstrukturen haben (Bryant-Greenwood und Schwabe, 1994; Bullesbach und Schwabe, 1994).

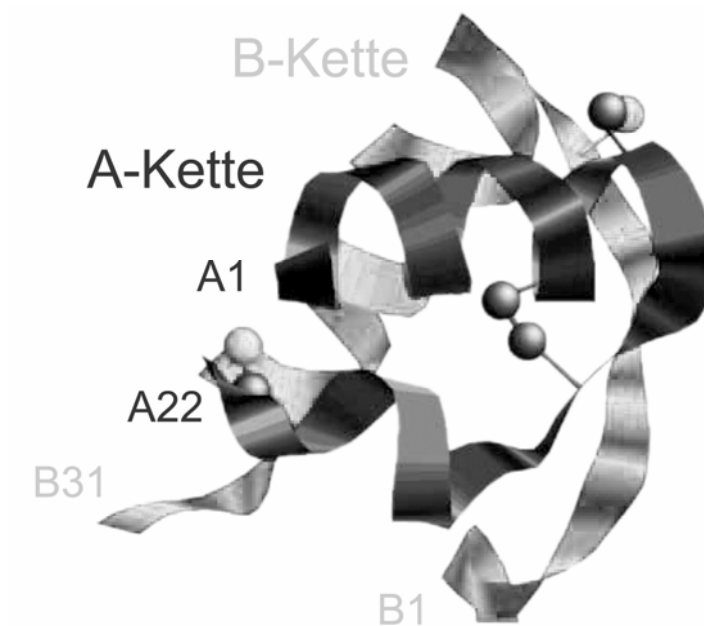


Abbildung 1: Kristallstruktur des porcinen Relaxin-A-B-Heterodimers mit Darstellung der Disulfidbrücken (modifiziert nach Ivell R und Einspanier, 2002).

### 1.1.3 Synthese

Relaxin wird, wie auch Insulin, in einer Präkursor-Form synthetisiert. Das sogenannte Präpro-Relaxin wird durch Abspaltung des Signalpeptides in Pro-Relaxin überführt.

Pro-Relaxin besitzt eine mit dem reifen Relaxin vergleichbare Bioaktivität und übt bereits eine Wirkung auf Zellen aus, bevor es zu Relaxin prozessiert wird (Bryant-Greenwood und Schwabe, 1994).

Aus der Physiologie des Insulins schlussfolgernd wird vermutet, dass die Prohormon-Konvertasen PC-1 und/ oder PC-2 durch Entfernung des C-Peptides das reife Relaxin erzeugen. Bisher gibt es allerdings nur einen In-vitro-Befund (Marriott et al., 1992), der eine endoproteolytische Aktivität von PC-1 beim Relaxin beschreibt.

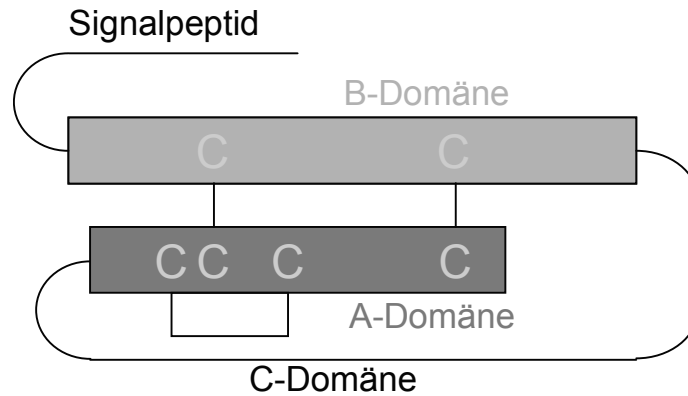


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Präpro-Relaxins mit Disulfidbrücken inklusive der Positionen der A- und B- Domäne, des Verbindungspeptides (C-Domäne) und des Signalpeptides (modifiziert nach Ivell R und Einspanier, 2002).

#### 1.1.4 Zirkulierende Relaxin-Spiegel

In der humanen Schwangerschaft finden sich charakteristische Veränderungen des Hormonspiegels: sein Maximum liegt zwischen der 10. und der 12. Woche bei ca. 1 ng/ ml; danach kommt es zum Abfall der Konzentration bis auf 400 pg/ ml in der 24. Woche. Nachfolgend bleibt der Plasmaspiegel bis zur Geburt annähernd konstant (Sherwood, 1994).

Bei nicht-schwangeren, menstruierenden Frauen kommt es zu einer leichten Erhöhung (ca. 50 pg/ ml) gegen Ende des Zyklus, hauptsächlich durch Produktion von Relaxin im Corpus luteum (Stewart et al., 1990).

#### 1.1.5 Gen-Isoformen

Es sind drei humane Relaxingene bekannt: H1, H2 und H3. H1 und H2 liegen in unmittelbarer Nachbarschaft auf Chromosom 9 (9p24) (Hudson et al., 1983; Hudson et al., 1984), H3 hingegen befindet sich auf Chromosom 19 (19p13.3) (Bathgate et al., 2001).

Es wird davon ausgegangen, dass H2 die einzige zirkulierende Form von Relaxin im Plasma ist (Bani, 1997a). Allerdings gibt es bisher noch keine spezifischen An-

tikörper für die Isoformen des Relaxins. Die Hauptquellen der Sekretion von H2 sind die weiblichen Reproduktionsorgane – Corpus luteum, Endometrium, Dezi-  
dua, Plazenta, Trophoblast und die Brustdrüse (Hudson et al., 1984; Gunnensen et al., 1996; Tashima et al., 1994; Bigazzi et al., 1980; Sakbun et al., 1990; Fields et al., 1992) – sowie die Prostata (Essig et al., 1982; Winslow et al., 1990).

Da man mit wenig sensitiven Methoden wie dem Northern Blot keine H1-Genexpression nachweisen konnte, wurde die These aufgestellt, dass H1 ein Pseudogen sei (Hudson et al., 1983). Durch die Entwicklung sensitiverer Untersuchungsmöglichkeiten wie die der RT-PCR konnte aber eine mRNA-Synthese in Brustdrüse (Tashima et al., 1994) und Prostata (Gunnensen et al., 1996; Hansell et al., 1991) festgestellt werden.

Über die Expression des erst vor kurzem gefundenen H3 gibt es kaum Erkenntnisse. Bathgate et al. konnten in Versuchen mit Ratten für das dem H3 entsprechende M3 vor allem eine Expression im Gehirn zeigen (Bathgate et al., 2001).

Neue Befunde belegen eine H1- und H2-mRNA-Synthese auch im Myokard und in arteriellen sowie venösen Gefäßen (Dschietzig et al., 2001).

### 1.1.6 Signaltransduktion

Wie schon seit längerem bekannt ist, wirkt Relaxin durch Stimulation der Adenylatzyklase (AC) mit folgender Erhöhung des zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Spiegels in der Zelle (Sanborn et al., 1980).

Im Jahre 2002 wurden zwei zellmembranständige „orphan receptors“ (rezeptorartige Strukturen für die noch kein Ligand entdeckt ist), LGR7 und LGR8, identifiziert, die durch Relaxin aktiviert werden (Hsu et al., 2002). LGR7-8 sind leucinreiche repetitive Sequenzen enthaltende G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Aus früheren Untersuchungen ist bereits bekannt, dass sowohl Tyrosinkinase-Inhibitoren (Bartsch et al., 2001a) als auch MAP-Kinase-Inhibitoren (Zhang et al., 2002) den cAMP-Anstieg blocken können. Bartsch et al. (2001a) vermuteten eine Aktivierung der Tyrosinkinase durch Phosphorylierung, welche zu einer Hemmung der Phosphodiesterase mit konsekutiver Verstärkung des cAMP-Anstiegs führt.

Die zweite große Signalachse des Relaxins ist die Erhöhung der Stickstoffmonoxid

(NO)-Konzentration mit nachfolgendem Anstieg des zyklischen Guanosinmonophosphates (cGMP) (Failli et al., 2001). Dieses wird zelltypabhängig über eine Erhöhung der Aktivität unterschiedlicher Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) erreicht (Übersicht in Dschietzig und Stangl, 2002).

### **1.1.7 Biologische Effekte**

#### *1.1.7.1 Prä- und Perinatale Effekte*

Seinen Namen erhielt Relaxin für die Induktion der auffälligen Längenzunahme des Ligamentum pubicum beim Meerschweinchen (Fevold et al., 1930). Zusätzlich führt es zu einer Vergrößerung und Erweichung des Zervix (Graham und Dracy, 1953). Diese, die Geburt erleichternden Faktoren, werden durch Veränderungen der extrazellulären Matrix (ECM) (Palejwala et al., 2001) erzielt, auf die später noch eingegangen wird.

Weiterhin scheint Relaxin beim Menschen eine Rolle bei der Implantation des Embryos zu spielen. Darauf deutet der die Differenzierung von endothelialen Stroma-Zellen auslösende Effekt des Hormons hin (Telgmann und Gellersen, 1998). Diese so genannte Dezidualisierung ist ein notwendiger Vorgang für die Einnistung der Blastozyste. Unterstützend wurde in Studien festgestellt, dass der Relaxin-Spiegel bei Frauen, die in der Frühphase einen Abort erleiden mussten, deutlich verändert war (Stewart et al., 1993) und die Granulosa-Zell-Produktion von Relaxin nach In-vitro-Fertilisation ein Marker für eine erfolgreiche Implantation ist (Stewart und VandeVoort, 1999). Die Unterdrückung spontaner Kontraktionen des Uterus scheint beim Menschen, im Gegensatz zu vielen anderen Spezies, kein ausgeprägter Effekt des Relaxins zu sein (Bryant-Greenwood und Schwabe, 1994; MacLennan et al., 1986; MacLennan und Grant P., 1991; Petersen et al., 1991; MacLennan et al., 1995).

Der wachstums- und differenzierungsfördernde Effekt (Hamolsky und Sparrow, 1945; Bani et al., 1985; Bani et al., 1986; Bianchi et al., 1986) auf die Brustdrüse konnte schon früh bei Ratten nachgewiesen werden. Ausgehend von Immunreaktivität für Relaxin in humanem Brustgewebe ergaben In-vitro-Befunde mit der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 einen differenzierungsfördernden und

wachstumshemmenden Effekt (Bani et al., 1995a; Bigazzi et al., 1992; Bani, 1997b) des Relaxins.

### *1.1.7.2 Bindegewebe:*

Relaxin hat einen kollagenabbauenden Effekt. In verschiedenen Tiermodellen unterdrückte es Organfibrosen, z.B. die Lungenfibrose unter Bleomycin bei Mäusen (Unemori et al., 1993) und die durch Bromethylamin induzierte interstitielle renale Fibrose bei Ratten (Garber et al., 2001). In vitro-Experimente an humanen Uterus-Fibroblasten zeigten eine erhöhte Expression der Matrix-Metallo-Proteasen (MMP)-1, -3 und -9 sowie eine Abnahme der Inhibitoren TIMP-1 und -2 (Palejwala et al., 2001; Ivell R und Einspanier, 2002). Die MMP als Endoproteasen können die extrazelluläre Matrix degradieren und somit zu einer Auflockerung des Bindegewebes führen. Diese Wirkung des Relaxins macht es interessant für die Behandlung der Sklerodermie. Letztere ist durch eine bindegewebige Verhärtung (Sklerose) der Haut und Fibrose einiger innerer Organe wie Ösophagus, Lunge oder Niere gekennzeichnet. Zur Überprüfung eines möglichen therapeutischen Effektes des Relaxins wurden zwei randomisierte, placebokontrollierte Doppelblind-Studien (Seibold et al., 2000; Erikson und Unemori, 2000) durchgeführt. In der Phase 2-Studie (Seibold et al., 2000) wurde u.a. eine signifikante Verringerung der Hautdickenzunahme, eine Verbesserung der Beweglichkeit und der Lungenfunktion nach 24 Wochen festgestellt. Diese Effekte konnten in der darauf folgenden Phase 3-Studie allerdings nicht signifikant bestätigt werden (Erikson und Unemori, 2000).

### *1.1.7.3 Gehirn*

Im Gehirn gibt es eine beträchtliche Anzahl von Relaxin-Bindungsstellen, insbesondere im Kortex (Osheroff und Phillips, 1991). Relaxin senkt die Sekretion von Oxytocin (O'Byrne et al., 1986) und stimuliert die Vasopressin (ADH)-Ausschüttung (Dayanithi et al., 1987). Die niedrigere Plasma-Osmolarität während der Schwangerschaft ist eine bekannte Auswirkung der erhöhten Relaxin-Spiegel (Weisinger et al., 1993).

### *1.1.7.4 Renale und vaskuläre Effekte*

Bereits 1985 konnte gezeigt werden, dass die Infusion von Relaxin zu einer deutlichen Abnahme des Blutdrucks bei spontan hypertensiven Ratten führt (St. Louis und Massicotte, 1985). Dem folgten mehrere Befunde über relaxinbedingte Vasodilatation in verschiedenen Gefäßgebieten, z.B. Endometrium (Vasilenko et al., 1986), Mesocaecum (Bigazzi et al., 1986), Koronarien (Bani-Sacchi et al., 1995) und Lebersinusoide (Bani et al., 2001). In einigen dieser Studien (Bani-Sacchi et al., 1995; Bani et al., 2001) wurde gezeigt, dass die Wirkung über eine vermehrte NO-Synthese vermittelt wird. Auch die renale Vasodilatation und glomeruläre Hyperfiltration (Danielson et al., 1999) bei Schwangeren scheinen durch Relaxin induziert zu sein. Die schwangerschaftsinduzierten Effekte verschwanden in einem Rattenmodell nach Entfernung des zirkulierenden Relaxins durch Antikörper oder durch Ovariectomie (Novak et al., 2001).

Relaxin scheint auch einen angiogenen Effekt zu besitzen. Unemori et al. zeigten eine Erhöhung des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Unemori et al., 1999), im speziellen an den Wundrändern (Unemori et al., 2000). Auch die Arbeitsgruppe um Palejwala wies eine Erhöhung des VEGF-Proteinspiegels in humanen endometrialen Zellen nach Relaxin-Stimulation nach (Palejwala et al., 2002). Die nach systemischer Gabe im Rahmen einer Sklerodermie-Studie aufgetretene Hypermenorrhoe (Seibold et al., 2000) könnte als Hinweis auf eine auch in vivo relevante angiogene Wirkung dienen.

### *1.1.7.5 Myokardiale Effekte*

Relaxin wirkt dosisabhängig positiv chronotrop und inotrop auf Vorhöfe von Rattenherzen (Parry et al., 1990; Kakouris et al., 1992; Ward et al., 1992). Die kräftigere Kontraktion der Vorhöfe scheint durch einen verzögerten Kalium-Ausstrom mit der Folge eines verlängerten Aktionspotentials und eines dadurch vermehrten Kalzium-Einstroms (Piedras-Renteria et al., 1997a; Piedras-Renteria et al., 1997b) bewirkt zu werden.

Auch die endokrine Funktion des Herzens wird beeinflusst; so konnte ein Anstieg



des atrialen natriuretischen Hormons (ANP) in isolierten Rattenherzen nachgewiesen werden (Toth et al., 1996). ANP wirkt als Gegenspieler des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, indem es sowohl natriuretisch wie auch diuretisch wirkt.

Dschietzig et al. zeigten 2001, dass Relaxin ein neuer kompensatorischer Mediator der Herzinsuffizienz ist. Die Plasmaspiegel und die myokardiale Expression des Relaxins korrelierten mit dem Schweregrad der Erkrankung und fielen bei erfolgreicher Therapie wieder ab. An isolierten Rattenherzen wurde ein Zusammenhang zwischen Ventrikelfüllungsdruck und Relaxinexpression im Herzen festgestellt (Dschietzig und Stangl, 2002). Als möglicher Mechanismus der vasodilatierenden Wirkung wurde eine vermehrte endotheliale Expression der Endothelin-1 (ET-1)-Rezeptoren vom Typ B festgestellt. Diese antagonisieren durch Freisetzung endothelialer dilatatorischer Mediatoren (NO, Prostazyklin) den kontrahierenden Effekt von Endothelin-1 am an den glattmuskulären ET-A- und ET-B-Rezeptoren und senken ferner durch Internalisierung und konsekutiven Abbau („Clearance“) des Endothelins den ET-1 Spiegel (Dschietzig und Stangl, 2002).

Aufgrund der massiv koronardilatierenden (Bani-Sacchi et al., 1995) und angiogenen (Unemori et al., 1999) Wirkung des Relaxins stellte sich die Frage, ob RLX kardioprotektive Eigenschaften besitzt. Ischämie-Reperusions-Versuche an Ratten zeigten, dass die Behandlung mit Relaxin die Menge des dauerhaft geschädigten Myokards und die Anzahl der in den Herzmuskel eingewanderten neutrophilen Granulozyten verringert. Ferner nehmen Rhythmusstörungen und Todesfälle ab (Masini et al., 1996; Bani et al., 1998b).

### *1.1.7.6 Hämostasis*

Einzelne Studien zeigten, dass Relaxin die Plättchenaggregation hemmt (Bani et al., 1995b) und ihre Gesamtzahl durch Hemmung des Zerfalls von Megakaryozyten senkt (Bani et al., 1995c). Diese auf ein antithrombotisches Profil hindeutenden Befunde werden verstärkt eine dosisabhängige Ausschüttung von Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA) (Too et al, 1984; Qin et al., 1997; Wang-Lee et al., 1998).

### 1.1.7.7 Immunologische Effekte

Relaxin reduzierte im Tierversuch mit auf Ovalbumin sensibilisierten Meer-schweinchen (Bani et al., 1997) deutlich die asthma-artigen Reaktionen nach Inha-lation des Antigens. Zu diesem anti-asthmatischen Effekt passend, konnte in vitro eine Stabilisierung von Mastzellen nachgewiesen werden (Masini et al., 1994). Ebenfalls konnte eine verstärkte Umwandlung von antigenspezifischen T-Zellen in T-Helfer-Zellen vom Typ 1 und eine vermehrte Interferon- $\gamma$ -Produktion von huma-nen T-Zell-Klonen festgestellt werden (Piccinni et al., 1999). Außerdem wurde die Entwicklung von allergenreaktiven-T-Helfer-Zellen vom Typ 2 gehemmt. Diese spielen durch Aktivierung von IgE-Antikörper produzierenden B Zellen, Mastzellen, und eosinophilen Granulozyten eine Schlüsselrolle bei der allergischen Entzün-dung (Piccinni et al., 2000).

Die bereits erwähnte Rolle von Relaxin bei der Implantation des Embryos scheint nicht nur auf der Vorbereitung der Gebärmutterschleimhaut (Dezidualisierung) zu beruhen, sondern auch auf Erhöhung der Immuntoleranz der Schwangeren. Dar-auf deutet hin, dass in Tierversuchen mit Mäusen gezeigt werden konnte, dass Relaxin die Expression des Glykoproteins Glykodelin steigert (Sunder und Lenton, 2000). Das Glykodelin A endometrialen Ursprungs besitzt immunsuppressive Fä-higkeiten (Seppala et al., 2001), so dass ein vorhandener Embryo vor Immunreak-tionen des weiblichen Körpers geschützt wird.

*1.1.7.8 Zusammenfassung*

Beschränkte sich das Wissen über Relaxin lange Zeit auf seine Rolle in der Schwangerschaft, sind in den letzten Jahren Erkenntnisse über eine Vielzahl neuer Effekte hinzugekommen. Eine kurze Übersicht gibt hierzu zusammenfassend Tabelle 1.

Tabelle 1: Die Wirkungen des Relaxins.

System	Wirkung
Kreislauf	<ul style="list-style-type: none"> <li>• erhöhter renaler Plasmafluss</li> <li>• erhöhte glomeruläre Filtrationsrate</li> <li>• Vasodilatation in vielen Geweben und Organen (z.B. Lunge, Uterus, Brustdrüse)</li> <li>• positiv chronotrop und inotrop</li> <li>• starke Steigerung des koronaren Blutflusses</li> <li>• Beeinflussung des Flüssigkeitshaushaltes durch ADH-Stimulation</li> </ul>
Schwangerschaft	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Implantation des Embryos</li> <li>• Wachstum und Differenzierung der Brust</li> <li>• Weitung des Geburtskanals durch Umbau der ECM</li> </ul>
Immunsystem	<ul style="list-style-type: none"> <li>• anti-asthmatisch</li> <li>• hemmt die Histamin-Ausschüttung aus Mastzellen</li> </ul>
sonstiges	<ul style="list-style-type: none"> <li>• unterdrückt die Ansammlung von Thrombozyten und ihren Ausstoß aus Megakaryozyten</li> <li>• stimuliert die Bildung von VEGF</li> </ul>

## 1.2 Glukokortikoid-Rezeptor

### 1.2.1 Sekretion der Glukokortikoide

Die physiologischen Glukokortikoide Kortisol und Kortison werden pulsatil aus der Nebennierenrinde in einem zirkadianen Rhythmus freigesetzt. Die Sekretion von ACTH aus der Hypophyse stimuliert die Synthese der Steroide. Der ACTH-Spiegel wiederum wird durch CRF aus dem Hypothalamus reguliert. CRF und ACTH unterliegen einer Rückwärtshemmung durch Glukokortikoide. Dieser Regelkreis wird auch als Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse bezeichnet (siehe Abbildung 3).

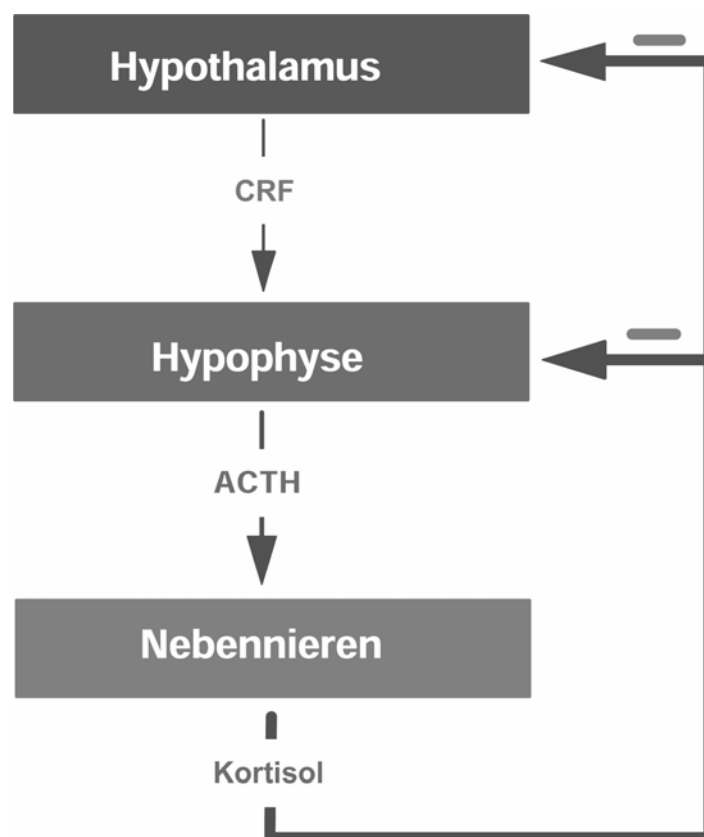


Abbildung 3: Schema der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse

Nach Sekretion aus den Zellen der Zona fasciculata werden Kortisol und seine Derivate im Blut an CBG („cortisol binding globulin“) oder Albumin gebunden transportiert (Übersicht in Riad et al., 2002).

### 1.2.2 Biologische Effekte von Glukokortikoiden

Glukokortikoide sind zentrale Mediatoren der Stress-Antwort (Sapolsky et al., 2000). Einen Überblick über die antiphlogistischen und immunsuppressiven Wirkungen von Glukokortikoiden gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Übersicht über die Wirkung der Glukokortikoide (Übersicht in Sapolsky et al., 2000; Umland et al., 2002).

Wirkung	Beispiele
Hemmung der Zytokinsynthese	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interleukin 1-6, 8, 11, 12, 16</li> <li>• IFN<math>\gamma</math>, TNF<math>\alpha</math></li> <li>• Granulozyten/ Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor</li> </ul>
Hemmung der Induktion proinflammatorischer Enzyme	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kollagenase</li> <li>• Phospholipase A2</li> <li>• Zykllooxygenase-2</li> </ul>
Hemmung der Expression von Zellinteraktionsmolekülen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selektine</li> <li>• Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1)</li> </ul>
Hemmung der Ausschüttung von präformierten Mediatoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Histamin</li> </ul>
Beschleunigter Abbau von Mediatoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bradykinin</li> <li>• Tachykinine</li> </ul>
Induktion von Akutphaseproteinen in der Leber	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C-reaktives Protein</li> </ul>

### 1.2.3 Wirkungsvermittlung über den Glukokortikoidrezeptor

Die lipophilen Glukokortikoide können die Zellmembran durch Diffusion überwinden und entfalten ihre zahlreichen Wirkungen durch die Bindung an den zytosolischen Glukokortikoid-Rezeptor (GR) (Sapolsky et al., 2000).

Eventuell gibt es noch andere bisher unbekannte nukleäre (Kliwer et al., 1998) oder sogar membranständige Rezeptoren für Glukokortikoide (Wehling, 1997), deren physiologische Bedeutung bleibt aber unsicher und wird in dieser Arbeit nicht weiter diskutiert werden. Gleiches gilt für eine mögliche ligandenunabhängige Aktivierung des GR, die für viele nukleären Rezeptoren beschrieben ist, aber für den GR nicht nachgewiesen wurde (Weigel und Zhang, 1998).

Das Gen des Glukokortikoidrezeptors ist auf dem langen Arm des Chromosoms 5 lokalisiert (5q31-5q32) (Schaaf und Cidlowski, 2002). Durch alternatives Splicing entstehen zwei Isoformen, GR $\alpha$  und GR $\beta$ , die sich nur an ihrem Carboxyl-Ende unterscheiden (Oakley et al., 1999).

GR $\alpha$  ist der „klassische“ GR, der die bekannten Glukokortikoid-Wirkungen vermittelt. Er ist in fast allen Geweben nachgewiesen (Pujols et al., 2002). Die physiologischerweise deutlich weniger exprimierte Splice-Variante GR $\beta$  bindet keine Kortikoide, sondern hemmt vermutlich die Wirkung des GR $\alpha$  (Oakley et al., 1996). Einen wichtigen Mechanismus scheint die Bildung von Heterodimeren mit GR $\alpha$  darzustellen, die nicht mehr transkriptionell aktiv sind (Oakley et al., 1999).

Um ein Kortikoid binden zu können, muss der GR im Zytosol als hetero-oligomerer Komplex mit verschiedenen Proteinen vorliegen (Dao-Phan et al., 1997; Wikstrom et al., 1986). Zu diesen rezeptorassoziierten Proteinen gehören HSP90 und HSP70. Über die Notwendigkeit zusätzlicher Proteine wie Hop oder Ydj1 herrscht noch Unsicherheit (Rajapandi et al., 2000). Nachdem das Steroid aufgrund seiner Lipophilie durch die Zellmembran diffundiert ist, lagert es sich an den zytosolischen GR-Protein-Komplex an, wodurch es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors kommt (Katzenellenbogen und Katzenellenbogen, 1996). Dies begünstigt die Dissoziation des Heterooligomers – es kommt zur Abspaltung von HSP90 und HSP70 – und verstärkt den Transport des GR in den Kern. Dort reguliert der Komplex aus Rezeptor und Glukokortikoid die Genexpression auf zwei Wegen. Erstens direkt nach Zusammenlagerung zu einem Homodimer als Transkriptions-

faktor durch Bindung an spezielle DNA-Sequenzen, so genannte „glucocorticoid response elements“ (GRE) bzw. „negative glucocorticoid response elements“ (nGRE) (siehe Abbildung 4). Zweitens indirekt durch Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- $\kappa$ B, NFAT und AP-1), das so genannte „cross-talk“ (Almawi und Melemedjian, 2002) (s.u.).

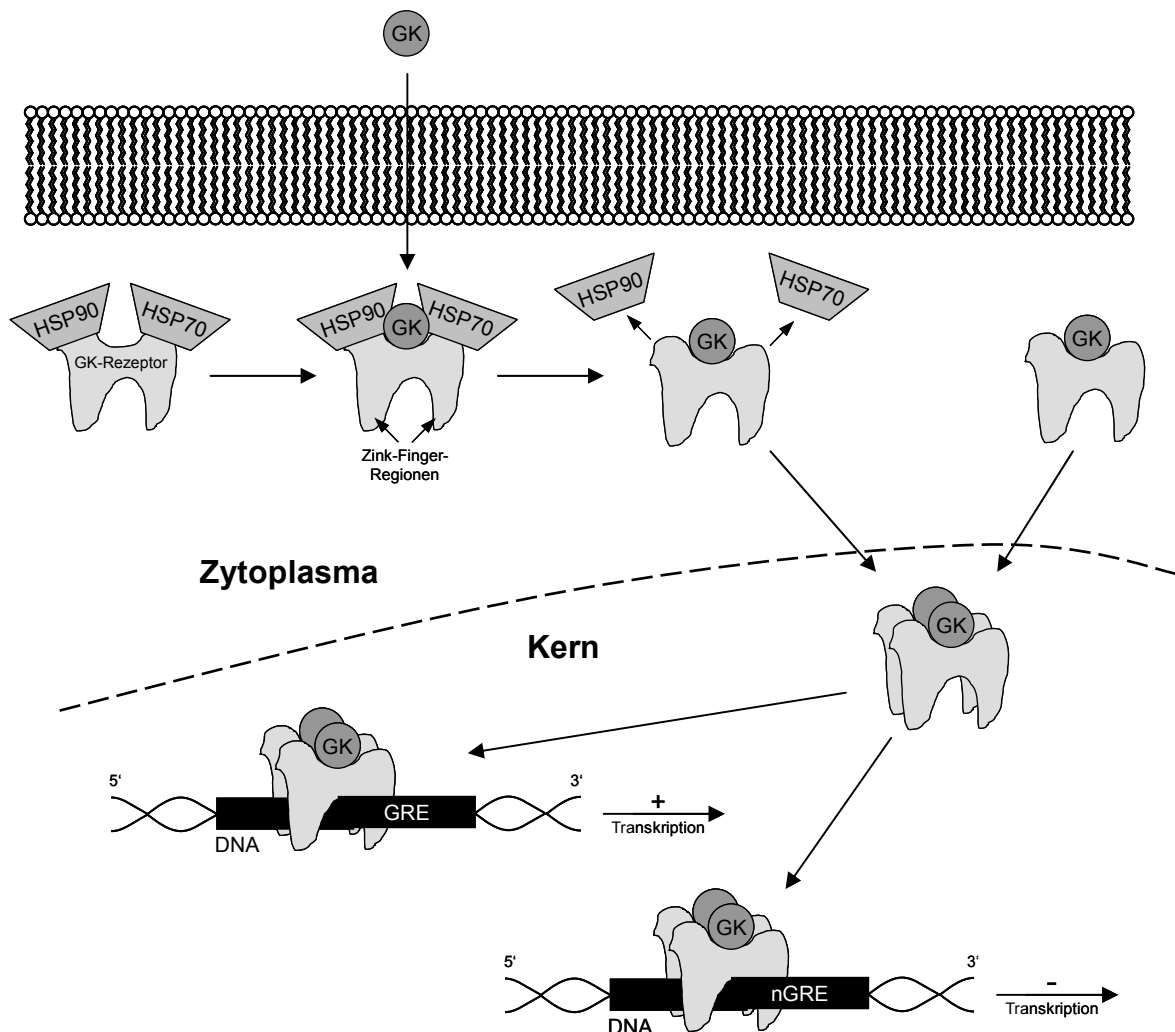


Abbildung 4: Schema der Wirkung des Glukokortikoidrezeptors als Transkriptionsfaktors. Glukokortikoide binden nach Überwindung der Zellmembran an den Rezeptor. Daraufhin lösen sich die HSP, und der GR wird in den Kern transloziert, wo er als Dimer an (n)GRE bindet und so Einfluss auf die Transkription nimmt (modifiziert nach Umland et al., 2002).

Für die indirekten Effekte („cross-talk“) des Glukokortikoidrezeptors gibt es mehre-

re Modelle (Almawi und Melemedjian, 2002):

- a) die Komplex-Bildung des aktivierten GR mit Transkriptionsfaktoren, so dass sie nicht mehr an die DNA binden können,
- b) die Unterdrückung der Aktivität des bereits an die DNA gebundenen Transkriptionsfaktors durch Anlagerung des GR und
- c) die Konkurrenz mit anderen Transkriptionsfaktoren um die für Stimulation bzw. Repression nötigen nukleären Kofaktoren.

### **1.2.4 Struktur des Glukokortikoidrezeptors**

Die Eigenschaft als Transkriptionsfaktor spiegelt sich auch in der Struktur des Rezeptors wider. Er besteht aus einer zentralen „DNA binding domain“ (DBD), einer c-terminalen „ligand binding domain“ (LBD) und einem N-terminalen Bereich, der ligandenunabhängig aktiv sein kann (Kumar und Thompson, 1999).

Die letzteren beiden besitzen transkriptionsaktivierende Funktionen (AF): AF-2 in der LBD wird direkt vom Hormon kontrolliert, AF-1 im N-terminalen Bereich hingegen übt seine Wirkung unabhängig vom Hormon aus (Kumar und Thompson, 1999).

### **1.2.5 Regulation der zellulären Konzentration von Glukokortikoidrezeptoren**

Es wurde gezeigt, dass die zelluläre Suszeptibilität für Glukokortikoide von der Anzahl der in der Zelle vorhandenen Glukokortikoidrezeptoren abhängt (Gehring et al., 1984).

Der Glukokortikoidrezeptor scheint einer Autoregulation zu unterliegen (Burnstein et al., 1991). In den meisten Geweben und Zelllinien wird durch Kortikoidgabe die Expression des GR herunterreguliert (Burnstein et al., 1991; Bellingham et al., 1992; Bronnegard, 1996). Der Mechanismus dieser homologen Herabregulation ist jedoch noch nicht völlig verstanden.

Die am nächsten liegende Erklärung für die Expressionsverminderung wäre eine Hemmung der Aktivität des GR-Promoters durch aktivierte Glukokortikoidrezeptoren. Tatsächlich wurden zwei Sequenzen im GR-Promotor gefunden, die Ähnlich-



keiten zu negativen GRE aufweisen. Andere Studien jedoch, bei denen mit Zellen, die mit einem heterologen GR-Promotor transfiziert waren, gearbeitet wurde, zeigten ebenfalls eine reduzierte Expression des GR (Übersicht in Schaaf und Cidlowski, 2002).

Auch Mechanismen auf Proteinebene werden diskutiert. Der GR wird nach Bindung eines Liganden hyperphosphoryliert (Bodwell et al., 1995), was eine deutliche Abnahme seiner Halbwertszeit zur Folge hat (Sapolsky et al., 2000; Webster et al., 1997). Der verstärkte Abbau des hyperphosphorylierten Rezeptorproteins scheint über das Proteasom abzulaufen (Wallace und Cidlowski, 2001).

Zusammengefasst spielen sowohl Effekte auf RNA- als auch auf Proteinebene bei der Abschwächung des Glukokortikoid-Effektes, die bis zur völligen zellulären Resistenz bei chronisch erhöhten Spiegeln führen kann (Silva et al., 1994), eine Rolle.

### **1.2.6 Glukokortikoidrezeptorantagonist RU-486**

RU-486 (Mifepriston) wurde als Wirkstoff der „Abtreibungspille“ bekannt. Der abortive Effekt beruht auf der starken antigestagenen Wirkung der Substanz.

RU-486 ist jedoch nicht nur ein Progesteron-, sondern ebenfalls ein sehr potenter Glukokortikoidrezeptorantagonist. Mifepriston gehört zu den so genannten Typ-I-Antagonisten, d.h., es bindet hochaffin an die LBD des Glukokortikoidrezeptors, diese ligandierten Rezeptoren binden auch an die DNA, aber üben dort jedoch keine Wirkung aus (Übersicht in Cadepond et al., 1997).

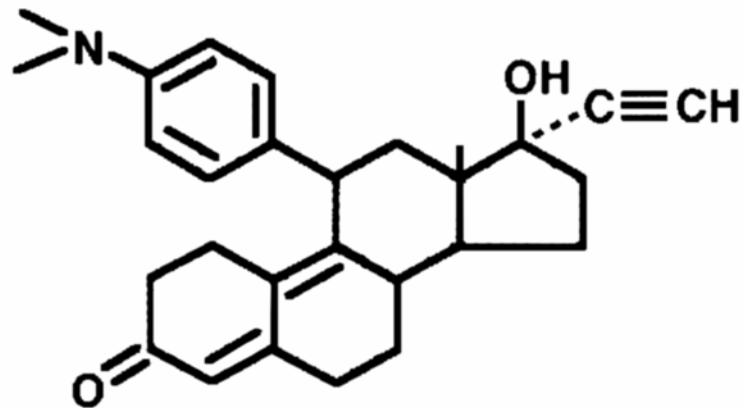


Abbildung 5: Strukturformel von Mifepriston (RU-486) (aus Cadepond et al., 1997).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die nachfolgend beschriebenen Experimente hatten zum Ziel, einen immunmodulatorischen, glukokortikoidartigen Effekt von Relaxin an Zelllinien des Reproduktionstraktes (HeLa-Zellen) und des Immunsystems (THP-1-Zellen bzw. Makrophagen) nachzuweisen und den Mechanismus zu untersuchen.

Nach positivem Befund fokussierte sich die Arbeit auf den Nachweis der Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors und die Beeinflussung seiner Expression durch Relaxin.

## **2 Materialien und Methoden**

Alle Experimente wurden mit immortalen Zervix-Karzinom-Zellen (HeLa) der Firma ATCC sowie mit einer humanen Monozyten-Leukämie-Zelllinie (THP-1), ebenfalls von ATCC, durchgeführt.

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Materialien**

- |                            |  |           |
|----------------------------|--|-----------|
| • 6 cm-Zellkulturschale    | 28 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche   | BD Falcon |
| • 10 cm-Zellkulturschale   | 78 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche   | BD Falcon |
| • Zellkulturflasche 50 ml  | 25 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche   | BD Falcon |
| • Zellkulturflasche 250 ml | 75 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche   | BD Falcon |
| • RPMI 1640 Medium         | inkl. 2 mmol/ l L-Glutamin   | Gibco     |
| • FCS                      | fötales Kälberserum  | Biochrom  |
| • Penicillin/ Streptomycin | 10.000 IE/ 10.000 µg/ ml   | Biochrom  |
| • PBS                      | Phosphat-gepufferte Salzlösung,<br>Dulbeccos Modifikation                          | Gibco     |
| • Trypsin-EDTA             | in Hanks Balanced Salt Solution<br>(HBSS) ohne Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> | Gibco     |
| • Zentrifuge               | Megafuge 1.0R  | Heraeus   |
| • HeLa-Zell-Medium         | RPMI 1640 Medium<br>plus<br>10% FCS<br>1% Penicillin/ Streptomycin                 |           |
| • ATCC-Medium              | RPMI 1640 Medium<br>plus<br>1,5 g/ l Natriumbikarbonat (NaH-<br>CO <sub>3</sub> )  |           |

4,5 g/ l Glukose  
10 mM HEPES  
1,0 mM Natriumpyruvat  
0,05 mM 2-Mercaptoethanol  
10% FCS  
1% Penicillin/ Streptomycin

### 2.1.2 Kulturbedingungen

Grundsätzlich wurden die Zellen in einem Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Um bakterielle Kontamination zu vermeiden, wurde an einer Werkbank mit gefilterter und laminar strömender Luft gearbeitet.

### 2.1.3 Zelltypen

#### 2.1.3.1 HeLa

Zur Gruppe der Adhäsionszellen gehörend wurden die HeLa-Zellen liegend in 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen mit 10 ml HeLa-Zell-Medium kultiviert. Sie wuchsen stets einlagig und wurden kurz vor Erreichen der Konfluenz passagiert.

Dazu wurde das Medium abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen, um an den Zellen haftende Serumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 1,5 ml Trypsin/ EDTA abgelöst. Die Protease war 90 Sekunden im Brutschrank aktiv, danach wurde die Reaktion mit dem FCS-haltigen HeLa-Zell-Medium gestoppt. Die Zellen wurden 1:8 verdünnt und erneut in Zellkulturflaschen ausgesät.

#### 2.1.3.2 THP-1

Die Kultivierung der THP-1- Suspensionszellen erfolgte in 5-10 ml ATCC-Medium in stehenden Zellkulturflaschen mit 50 ml Gesamtvolumen. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt. Dazu wurden die Zellen für 10 Minuten mit 1000 U/ min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde vorsichtig das alte ATCC-Medium abgesaugt und neues hinzugefügt. Wenn die mittels Neubauer-

Zählkammer bestimmte Zelldichte  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ ml überschritt, erfolgte eine Teilung im Verhältnis 1:1. Daraus resultierte ein wöchentlicher Teilungsrhythmus. Die maximale Kulturdauer betrug 18 Wochen.

### 2.1.4 Zeitkinetiken

Grundsätzlich wurden Versuche mit verschiedenen Expositionszeiten so konzipiert, dass alle Zellen zum gleichen Zeitpunkt lysiert bzw. vermessen wurden. Das heißt, die Gruppen eines Versuches unterscheiden sich im Behandlungsbeginn, nicht aber im Endpunkt. Durch diesen Aufbau wurde lediglich *eine* Zeitkontrolle benötigt.

## 2.2 Protein-Nachweismethoden

### 2.2.1 Präparation von Kern-/ Zytoplasma-Extrakten

#### 2.2.1.1 Prinzip

Zur getrennten Analyse von Kern- bzw. Zytoplasma-Bestandteilen wurde mit leichten Modifikationen die von Osborn und Kollegen 1989 beschriebene Methode verwendet, die eine Separation bei der Zellyse ermöglicht.

Durch Zugabe des hypoosmolaren Puffers A werden die Zellen zum Schwellen gebracht. In diesem Zustand maximaler Spannung der Zellmembran kann sie durch Zugabe einer geringen Menge Detergenz zum Aufreißen gebracht werden. Nach Sedimentation der Kerne kann als Überstand der Zytoplasmaextrakt gewonnen werden. Die als Pellet verbliebenen Zellkerne können nun lysiert und extrahiert werden.

#### 2.2.1.2 Materialien

- Nonidet P-40 (12,5%) Octylphenolpoly(ethylenglykolether); nichtionisches Detergenz zur Solubilisierung von Membranproteinen Roche
- PefaBloc SC 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid; Roche

breit wirksamer Serinproteinaseninhibitor

- Puffer A
  - 10% Glycerol
  - 10 mM Tris, pH 7,9
  - 10 mM KCl
  - 10 mM NaF
  - 10 mM  $K_2HPO_4$
  - 1,5 mM  $MgCl_2$
  - 1 mM  $NaVO_3$  (Natrium(meta)Vanadat)
  - direkt vor Nutzung:
    - 0,5 mM DTT
    - 0,5 mM PefaBloc SC
- Puffer C
  - 10% Glycerol
  - 0,42 M NaCl
  - 20 mM Tris, pH 7,9
  - 10 mM NaF
  - 10 mM  $K_2HPO_4$
  - 1,5 mM  $MgCl_2$
  - 1 mM  $NaVO_3$  (Natrium(meta)Vanadat)
  - 0,2 mM EDTA
  - kurz vor Nutzung:
    - 0,5 mM DTT
    - 0,5 mM PefaBloc SC

Wenn nicht anders angegeben, erfolgten alle Zentrifugationsschritte bei 4°C für 10 Minuten.

Die Zellkulturschälchen (10 cm) mit HeLa-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl Trypsin/ EDTA abgelöst. Die Zellen wurden in 1,5 ml PBS aufgenommen und in einem 2 ml fassenden Reaktionsgefäß mit 1000 U/ min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet mit 1 ml Puffer A gewaschen und erneut mit 1000 U/ min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 150 µl Puffer A resuspendiert. Um die Zytoplasmamembranen zu lysieren, wurde nun 1 µl des Detergens Nonidet P-40 zugegeben. Nach 2 min er-

folgte zur Trennung von Zytoplasmabestandteilen und Kernen erneut ein Zentrifugationsschritt bei 1000 U/ min. Der dem Zytoplasmaextrakt entsprechende Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert.

Die als Pellet verbliebenen Kerne wurden mit 40 µl Puffer C lysiert und mit 13.000 U/ min zentrifugiert. Der die Kernextrakte enthaltende Überstand wurde ebenfalls in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert.

Im Anschluss wurden die Proteinkonzentrationen nach Bradford bestimmt. Das Messprinzip beruht auf einem von der Proteinkonzentration abhängigen Farbumschlag von dunkelgrün zu blau (Absorptionswechsel von 465 zu 595 nm), der durch Bildung von Coomassie-Protein-Komplexen entsteht.

Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei minus 70°C gelagert.

### 2.2.2 Western Blots

#### 2.2.2.1 Materialien

- Acrylamid aus Acrylamid und Bisacrylamid, Rotiphorese Gel 29:1 (40%) Carl Roth GmbH & Co.
- Tris Tris(hydroxymethyl)aminomethan Serva Feinbiochemica
- TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin Sigma
- APS Ammoniumperoxydisulfat Sigma
- Proteinmarker 6,5 - 175 kDa New England Biolabs
- Tischzentrifuge 5415C Eppendorf
- Elektrophoresekammer Dual Mini, 11 X 10 cm Sigma-Aldrich
- Stromversorgungsgerät EPS 600 Pharmacia Biotech

- Roti-Block Carl Roth GmbH & Co.
- Blotkammer Semi-Dry Transfer Cell  
Trans-Blot SD Bio-Rad
- Thermomixer 5437 Eppendorf
- ECL Enhanced Chemiluminescence Lösung Amersham
- Film X-Omat Blue XB-1, 18 x 24 cm Kodak
- Entwicklermaschine Hyperprocessor Amersham
- Densitometrie Image-Master 1D Prime, Version 2.01, © 1996-97  
Nonlinear Dynamics, Ltd. Hoefer Pharmacia Biotech

### 2.2.2.2 Lösungen

- TBS: mit Tris gepufferte Salzlösung;  
50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  
150 mM NaCl  
pH 7,4 HCl
- 5x SDS-Probenpuffer: 60 mM Tris pH 6,8  
25% Glyzerol (Sigma)  
5%  $\beta$ -Mercaptoethanol (Serva)  
2% SDS  
0,1% Bromphenolblau (Serva)
- SDS-Laufpuffer: 2,5 mM Tris  
19,2 mM Glycin  
0,01% SDS  
pH 8,8
- Transferpuffer: 20% Methanol



- 2 mM Tris
  - 15 mM Glycin
- RIPA-Puffer
  - 20 mM Tris-Cl pH 7,5
  - 420 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 0,2 mM EDTA
  - 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>
  - 10 mM NaF
  - 1,25% NP40
  - 10% Glycerin
- Waschpuffer:
  - 0,02% Tween 20 (Aldrich) in TBS

### 2.2.2.3 Antikörper:

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller
<i>GR (H-300)</i>	Erstantikörper Kaninchen, polyklonal, IgG, erkennt $\alpha$ - und $\beta$ - Isoform,	1:2.500	Santa Cruz
<i>Anti-Kaninchen</i>	Zweitantikörper Esel, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase	1:5.000	Jackson Immuno- Research Labora- tories Inc., via Dianova

### 2.2.2.4 Prinzip:

Western Blots ermöglichen den quantitativen Nachweis spezifischer Proteine. Dafür werden diese zunächst durch Aufkochen und Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. Das negativ geladene SDS, welches sich proportional zum Molekulargewicht der Proteine an diese bindet, verleiht den Proteinen eine negative Außenladung. Dies ermöglicht das Auftrennen der Proteine nach ihrer Größe in einer Gel-Elektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970), bei welcher die Proteine in einem elektrischen Feld zur Anode wandern. Anschließend werden die Proteine

auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen („geblottet“) und mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Da die eingesetzte Acrylamidkonzentration den Vernetzungsgrad der Gele und somit die Laufeigenschaften der Proteine beeinflusst, wurde sie mit 10% an die 90 bzw. 95 kDa großen GR-Isoformen angepasst.

Tabelle 4: Ansatz für 4 SDS-Gele

	10% Trenngel	Sammelgel
dd H <sub>2</sub> O	12 ml	14,6 ml
1,5 M Tris pH 8,8	6,25 ml	–
1 M Tris pH 6,8	–	2,5 ml
40% Acrylamid	6,25 ml	2,5 ml
SDS	250 µl	200 µl
APS	200 µl	200 µl
TEMED	20 µl	10 µl

#### 2.2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Eine vom Zelltyp abhängende Lysatmenge wurde ad 20 µl mit RIPA-Puffer vermengt und mit 5 µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Nach fünfminütigem Erhitzen bei 95°C im Thermocycler wurden die Proben kurz an zentrifugiert, abgekühlt und in die Geltaschen pipettiert. Die Proteinauftrennung durch Elektrophorese dauerte bei 20 mA/ Gel ca. 1 Stunde. Daraufhin wurden die Gele aus den Kammern entnommen, zurechtgeschnitten und mit Blotpuffer inkubiert.

#### 2.2.2.6 Proteintransfer

Hierbei wurden die im Gel aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF) übertragen. Dazu wurden eine PVDF-Membran und sechs Whatman-Papiere auf etwa Gelgröße zurechtgeschnitten. Zur Aktivierung wurde die PVDF-Membran eine Minute in Methanol, zwei Mi-

nuten in Aqua bidest. und fünf Minuten in Blotpuffer geschwenkt. Die Whatmanpapiere wurden ebenfalls mit Blotpuffer angefeuchtet.

Nun wurden drei Whatmanpapiere auf den als Anode dienenden Boden der Blotkammer gelegt, darauf die PVDF-Membran, darauf das Gel und abschließend kathodenseitig wieder drei Whatmanpapiere. Durch Ausstreichen wurde sichergestellt, dass keine Luftblasen den Kontakt von Membran und Gel behinderten. Für das elektrische Feld wurde ein konstanter Strom von 350 mA bei maximal 4 Watt über eine bis anderthalb Stunden gewählt.

### *2.2.2.7 Antikörperbindung*

Das Schwenken der PVDF-Membranen über zwei Stunden bei Raumtemperatur in 10 ml Roti-Block minimierte die unspezifische Bindung. Roti-Block enthält eine hohe Konzentration unspezifischer Proteine, die die freien Bindungsstellen auf der PVDF-Membran besetzen. Daraufhin wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit dem in Roti-Block gelösten Erstantikörper unter leichtem Schwenken inkubiert.

Am Folgetag wurden die Membranen viermal jeweils 10 Minuten mit Western-Blot-Waschpuffer gewaschen und danach zwei Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen wurden die Membranen eine Minute in der ECL-Lösung geschwenkt.

Die am zweiten Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase oxidiert das Luminol des ECL. Das durch die Oxidation angeregte Luminol fällt anschließend unter Lichtemission in den Grundzustand zurück. Das ausgesandte Licht wurde mittels Filmauflage registriert. Die entwickelten Filme wurden gescannt und mit der Software ImageMaster 1D densitometrisch ausgewertet.

### 2.2.3 Immunpräzipitation

#### 2.2.3.1 Materialien

- Protein A-Sepharose in PBS  
Pharmacia Biotech
- GR-Antikörper siehe Tabelle 3  
Santa Cruz
- Schüttler Test Tube Rotator  
Neolab
- Zentrifuge 5417 C  
Eppendorf

#### 2.2.3.2 Prinzip

Bei der Immunpräzipitation werden spezifische Antikörper benutzt, um Proteine aus komplexen Gemischen (z.B. Zelllysate) selektiv auszufällen. Dazu wurde der Antikörper an Protein A-Sepharose gekoppelt und mit der Proteinmischung inkubiert.

Nach der Sedimentierung der an Protein A-Sepharose gebundenen Immunkomplexe durch Zentrifugation folgen mehrere Waschschriffe, um noch vorhandene ungebundene Proteine zu entfernen. Abschließend wird die Antikörper-Antigen-Bindung getrennt und das Proteingemisch extrahiert. Dieses kann z.B. in Western Blots analysiert werden.

#### 2.2.3.3 Kopplung des Antikörpers mit Protein A-Sepharose

Pro Ansatz wurde 50 µl Protein A-Sepharose mit 3 µg spezifischem Antikörper vermengt und für ca. 2 Stunden bei 4°C geschüttelt. Danach wurde kurz anzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in PBS gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde in einer den Ansätzen entsprechenden Menge PBS aufgenommen.

### 2.2.3.4 Herstellung des Zelllysats

Es wurde mit Zellkulturschalen von 10 cm Durchmesser gearbeitet. Die Konfluenz betrug ca. 80%.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 350 µl RIPA lysiert. Durch zweimaliges Pressen durch Kanülen mit erst 0,6 dann 0,4 mm Durchmesser wurde das Lysat homogenisiert. Danach wurde sieben Minuten mit 14.000 U/ min bei 4°C zentrifugiert. Um unspezifische Bindungen zu verhindern wurde der Überstand mit 50 µl Protein A-Sepharose versetzt und 30 Minuten bei 4°C geschüttelt.

### 2.2.3.5 „Fischen“ des spezifischen Proteins

Das Zelllysate wurde mit dem Antikörper-Protein A-Sepharose-Komplex versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Danach wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zehnmal mit 300 µl RIPA gewaschen und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Um den Antikörper zu denaturieren, wurde 5 Minuten bei 94°C inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde anzentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet mit 10 µl Aqua dest. reextrahiert. Nach erneuter kurzer Zentrifugation wurden die beiden Überstände vereinigt und im Western Blot weiter verarbeitet.

## 2.3 Gesamt-RNA-Extraktion

### 2.3.1 Prinzip

Die Gesamt-RNA wurde mit Trizol isoliert. Trizol von Gibco ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, die die Zellen auflöst und gleichzeitig die Ribonukleinsäuren stabilisiert. Zugabe von Chloroform trennt die Lösung in eine organische und eine wässrige, die RNA enthaltende Phase. Um eine Kontamination mit ubiquitär vorkommenden RNasen zu verhindern, wurden alle Schritte mit Handschuhen und RNase-freien Materialien durchgeführt.

### 2.3.2 Protokoll

Um RNase-freies Wasser zu erhalten, wurde Wasser mit 0,01% DEPC versetzt, über Nacht stehen gelassen und anschließend autoklaviert.

Die Zellschälchen (6 cm) wurden mit 1,7 ml Trizol beschichtet und mehrfach mit einer Pipette abgespült. Das Homogenisat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten bei 30°C inkubiert, um die vollständige Trennung von Nukleinsäuren und Proteinen zu gewährleisten. Nach Zugabe von 340 µl Chloroform und kräftigem Schütteln wurden die Reaktionsgefäße erneut für 2 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation mit 10.000 U/ min bei 4°C erhielt man eine untere Phenol- und eine obere wässrige Phase. Die letztere wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. In diesem wurde durch Zugabe von 850 µl Isopropanol die RNA gefällt. Nach Sedimentierung durch 30-minütige Zentrifugation bei 12.000 U/ min und 4°C wurde der Überstand sorgfältig entfernt. Das Pellet wurde zweimal mit 75% Ethanol gewaschen und abschließend kurz bei 30°C luftgetrocknet. Das RNA-Pellet wurde in RNase-freiem Wasser gelöst und im Photometer vermessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Spektralphotometrie bei einer Wellenlänge von 260 nm, wobei 1 OD<sub>260</sub> 40 µg RNA/ ml entsprechen (Sambrook et al., 1989).

## 2.4 PCR

### 2.4.1 Materialien

- |                                |  |                    |
|--------------------------------|--|--------------------|
| • Erststrang-Synthese-Kit      | 1 <sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit, Katalog-Nr. 1483188 | Roche              |
| • Cyclor                       | Mastercycler   | Eppendorf          |
| • Amplitaq Gold DNA Polymerase | 5 Einheiten/ µl  | Applied Biosystems |

### 2.4.2 Erststrang-Synthese

Da die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nur mit DNA durchgeführt werden kann, wurde die isolierte RNA mittels einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrie-

ben. Durch den Einsatz von Oligo-dT-Primern werden nur polyadenylierte mRNA-Stränge umgeschrieben.

Diese Erststrangsynthese wurde mit einem Kit von Roche durchgeführt. Es wurden 2 µg RNA eingesetzt; das Reaktionsvolumen betrug 20 µl je Ansatz (10 mM Tris, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM je dNTP (Desoxynukleosidtriphosphat), 0,04 A<sub>260</sub> Einheiten Oligo-p(dT)<sub>15</sub>, 50 Einheiten/ Ansatz RNasin und mindestens 12 Einheiten/ Ansatz AMV (Avian-Myeloblastosis-Virus)-Reverse-Transkriptase). Die Ansätze wurden zur Primeranlagerung 10 Minuten bei 25°C inkubiert, im Anschluß eine Stunde auf 42°C gehalten, um der RT optimale Bedingungen zu gewährleisten, und danach 5 Minuten bei 94°C denaturiert.

### 2.4.3 Prinzip der PCR

Die 1983 von Kary Mullis entwickelte Polymerase-Kettenreaktion erlaubt es spezifische DNA-Sequenzen in kurzer Zeit enorm zu vervielfältigen. Zur Amplifikation eines spezifischen DNS-Fragmentes benötigt man lediglich zwei Primer, die diese Sequenz einschließen, eine hitzeresistente DNA-Polymerase und die vier DNA spezifischen dNTPs. Durch bis zu 40 Zyklen der drei Phasen

- Erhitzung zur Trennung der DNA Doppelstränge
- Abkühlung zur Anlagerung der Primer („annealing“)
- und folgender Elongation durch die Polymerase

entstehen in exponentieller Geschwindigkeit Doppelstränge der DNA-Sequenz zwischen den Primern.

Der Ansatz kann in einem Agarosegel aufgetrennt werden; die Bandenstärke dient als semiquantitativer Maßstab für die Menge der Ausgangs-DNA.

### 2.4.4 Protokoll

Die Amplifikation der cDNA mittels PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl in folgendem Standardansatz:

- 15 mM Tris-HCl, pH 8,0

- 50 mM KCl
- 3 mM MgCl<sub>2</sub>
- 200 μM je dNTP
- 0,26 μM 3' Primer
- 0,26 μM 5' Primer
- 2,5 Einheiten/ Ansatz Taq DNA-Polymerase
- 1 μl cDNA

Für GR $\alpha$  und  $\beta$  konnte der gleiche 5' Primer verwendet werden. Beide Primerpaare sind exonüberspannend gewählt, so dass bei eventueller Kontamination der RNA-Präparation mit genomischer DNA ein längeres, da intronenthaltendes Amplifikationsprodukt entstehen würde. Daher konnte auf einen Verdau mit DNase verzichtet werden.

Tabelle 5: Primersequenzen

3' Primer	5' Primer
GR $\beta$ : GCT TTC TGG TTT TAA CCA CA	GR $\alpha$ und $\beta$ :
GR $\alpha$ : TTT CCA TTT GAA TAT TTT GG	GAA TGA CTC TAC CCT GCA TG

Nach einer ersten 10-minütigen Denaturierung der DNA und Aktivierung der Polymerase bei 94°C wurden 40 Zyklen mit folgenden Parametern durchgeführt:

- 94°C für 1 Minute (Denaturierung)
- 55°C für 1 Minute (Anlagerung der Primer)
- 72°C für 1 Minute (Transkription)

Zur Komplettierung angefangener DNA-Ketten durch die DNA-Polymerase wurde abschließend die Temperatur für 10 Minuten auf 72°C gehalten.

#### **2.4.5 Analyse von PCR-Fragmenten**

Die DNA ist bei neutralem pH durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen und



wandert deshalb zur Anode. Wenn diese Bewegung durch ein Agarosegel erschwert wird, trennt sich die DNA der Größe nach auf. Ethidiumbromid lagert sich in die doppelsträngige DNA ein (sog. Interkalation), wodurch es eine deutliche Fluoreszenzverstärkung erfährt. Daraus resultieren im UV-Licht Banden, deren Größe und Intensität zur Quantifizierung dienen.

Jeweils 10 µl der Ansätze wurden in einem 2%-igem Agarosegel in 1 x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel enthielt 0,7 µg Ethidiumbromid/ ml. Die Spannung betrug 150 V, die Elektrophoresezeit ca. 60 min.

## 2.5 Transiente Transfektion

### 2.5.1 Prinzip

Als transiente Transfektion wird die vorübergehende Einschleusung von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen bezeichnet.

Um die Zellen schonend und effizient zu transfizieren, wurde die Methode der Lipofektion gewählt. Es wurde mit dem „Effectene Transfection Reagent“ von Qiagen gearbeitet. Das Prinzip dieses Reagenz beruht auf der Kondensation der zu transfizierenden DNA mit Hilfe eines Verstärkers (Enhancers) unter definierten Pufferbedingungen (EC-Puffer). Das zugefügte Effectene-Reagenz assoziiert sich mit der kondensierten DNA und formt auf diese Weise spontan Mizellen gleicher Größe und Struktur, was zu einer besonders hohen und reproduzierbaren Transfektionseffizienz führen soll. Die mit DNA beladenen Phospholipidpartikel verschmelzen mit der Zellmembran und setzen die DNA ins Zellinnere frei. Von dort aus gelangt sie in den Zellkern, wo sie transkribiert wird, was schließlich auch zur Proteinexpression führt.

### 2.5.2 Protokoll

0,5 bis 1 µg des GRE-luc-Reporter-gen-Konstrukts wurden in 150 µl EC-Puffer verdünnt, mit 4 µl Enhancer versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur kondensierten DNA wurden 10 µl Effectene gegeben, dann wurde kurz geschüttelt und für 10 Minuten bei RT zur Mizellenbildung inkubiert. Währenddessen wurden die mit PBS gewaschenen Zellen in 6-cm-Zellkulturschalen mit 4 ml Optimem Medium von Gibco überschichtet. Nach Zugabe von 500 µl Optimem wurden

die Ansätze vorsichtig tropfenweise auf die zu ca. 70% konfluenten Zellen pipetiert. Für 6 Stunden wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C inkubiert und danach das Medium durch 3 ml RPMI mit 1% FCS und 1% Penicillin/ Streptomycin ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen mit Relaxin stimuliert.

## 2.6 GRE-Luziferase-Messungen

### 2.6.1 Prinzip

Der verwendete pGRE-luc Vektor (siehe Abbildung 6) ist ein Konstrukt aus dem „Glucoorticoid Response Element“ und dem Gen des Enzyms Luziferase. Dieses vielverwendete Reporter-gen entstammt der südamerikanischen Feuerfliege, *Photinus pyralis*. Es kann eine Reaktion mit einem Luziferin genannten Substrat katalysieren, welche unter Lichtemission erfolgt. Bei Zugabe von Substrat im Überschuss ist die Menge des emittierten Lichtes proportional zur transkriptionellen Aktivität des vorgeschalteten GRE und somit ein Marker für die Aktivierung des GR.

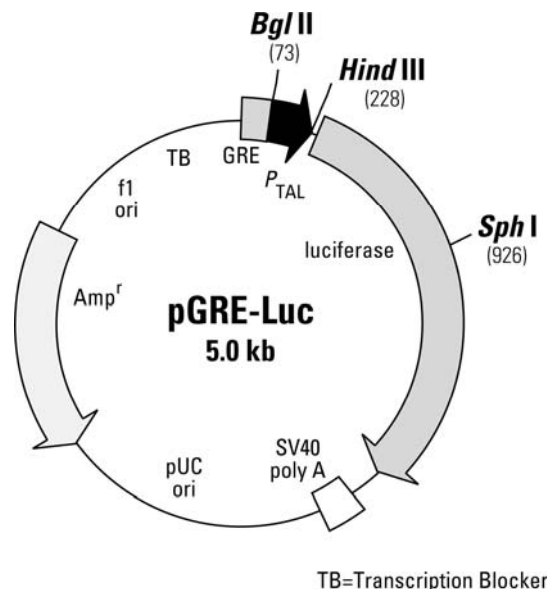


Abbildung 6: Aufbau des pGRE-Luziferase Vektors mit Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen (aus BD Biosciences Clontech, 2002).



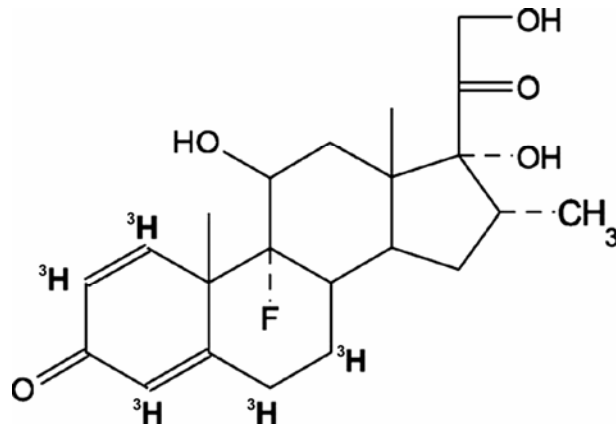


Abbildung 7: Struktur des hochpotenten, synthetischen Glukokortikoids Dexamethason. Das im Rahmen der Radioligandenbindung-Experimente verwendete Glukokortikoid ist an den Positionen 1, 2, 4, 6 und 7 mit Tritium markiert.

Zur Unterscheidung von spezifischer Bindung des markierten Dexamethasons an den Rezeptor und unspezifischer Bindung im Zellinneren wurden in einem Parallelansatz durch die Zugabe der ca. 100-fachen Menge (10  $\mu\text{mol/l}$ ) an nicht markiertem Hormon alle Bindungsstellen vor Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Dexamethason abgesättigt. Die dort gemessene Aktivität entsprach der Größe der unspezifischen Bindung ( $B_{\text{NS}}$ ), mit deren Hilfe sich die spezifische Bindung ( $B_{\text{S}}$ ) an den GR errechnen lässt:

$$\text{Gesamtbindung } (B_{\text{G}}) - \text{unspezifische Bindung } (B_{\text{NS}}) = \text{spezifische Bindung } (B_{\text{S}}).$$

Mit steigender Konzentration des  $^3\text{H}$ -Dexamethasons nimmt die spezifische Bindung zunächst zu, bis sie einen Sättigungsbereich erreicht, in dem die Rezeptorbindungsstellen belegt sind und es dadurch zu keinem weiteren Anstieg der  $B_{\text{S}}$  kommt (siehe Abbildung 8). Dieser Punkt ist daher ein Maß für die Rezeptorkonzentration ( $B_{\text{max}}$ ) in der Zelle.

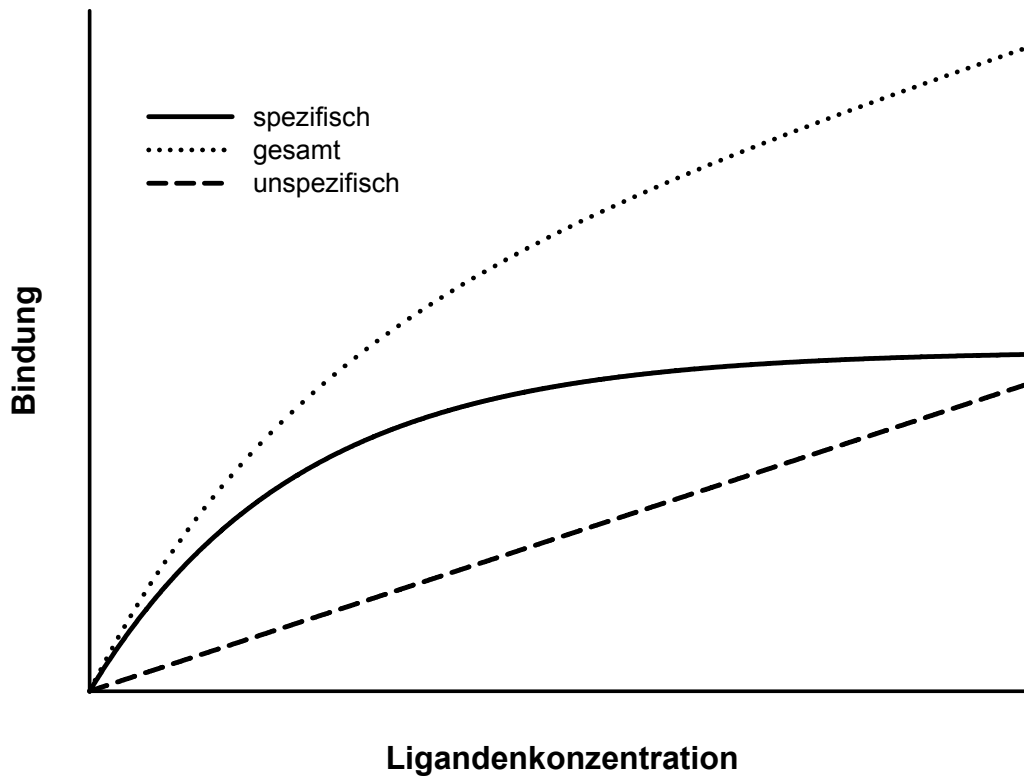


Abbildung 8: Spezifische, unspezifische und Gesamtbindung in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration.

### 2.7.2 Berechnung der Rezeptorkonzentration und der Dissoziationskonstanten

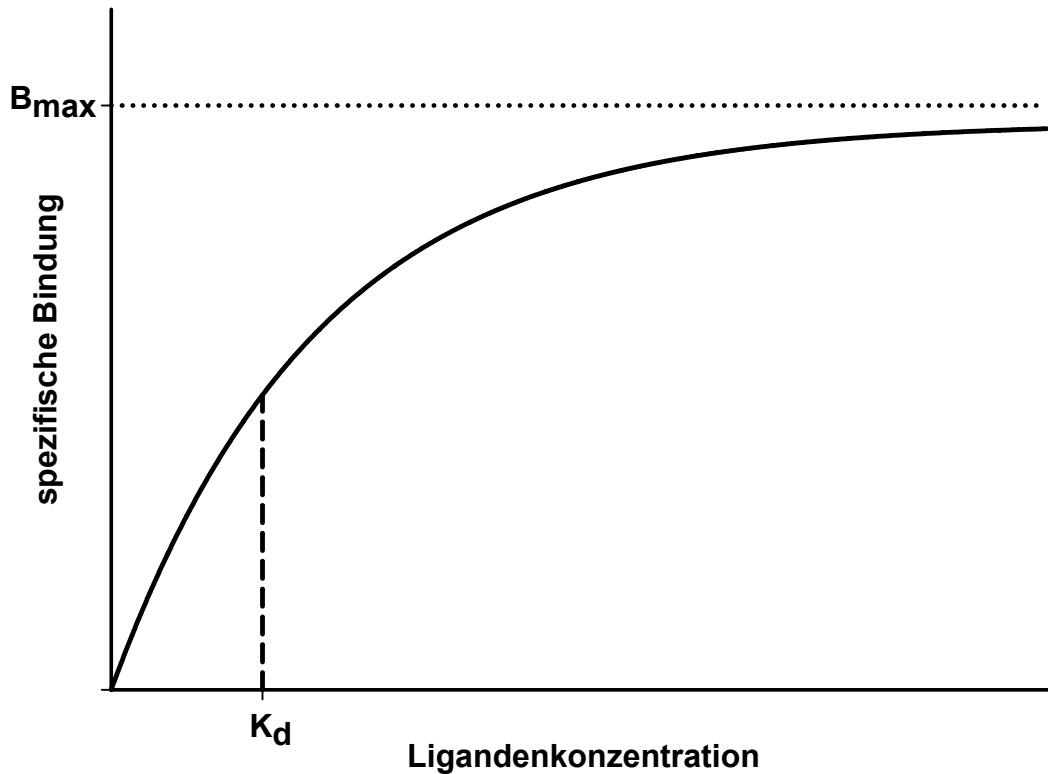


Abbildung 9: Spezifische Bindung in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration.  $B_{\max}$  = maximal an Rezeptor gebundenes Hormon.  $K_d$  = Dissoziationskonstante, entspricht der Ligandenkonzentration bei 50%-iger Rezeptorbindung.

Die Rezeptorkonzentration ( $B_{\max}$ ) und die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) können aus der Kurve der spezifischen Bindung bestimmt werden. Voraussetzung dafür ist, dass die Bindung dem Massenwirkungsgesetz folgt und ein Sättigungsgleichgewicht eingetreten ist.

Es sei:

F = freies Hormon

B = an Rezeptor gebundenes Hormon

$B_{\max}$  = maximal an Rezeptor gebundenes Hormon

Dann ist  $K_d$  folgendermaßen definiert (Green und Leake, 1987):

$$K_d \left[ \frac{\text{mol}}{\text{l}} \right] = \frac{F \cdot (B_{\max} - B)}{B} \quad (1)$$

Die  $K_d$  ist also umgekehrt proportional zur Affinität eines Liganden zu seinem Rezeptor. Je kleiner die  $K_d$ , umso höher ist die Affinität.

Wenn nun  $B = \frac{1}{2} B_{\max}$  entspricht, folgt durch einsetzen in (1):

$$K_d \left[ \frac{\text{mol}}{\text{l}} \right] = \frac{F \cdot (B_{\max} - \frac{1}{2} B_{\max})}{\frac{1}{2} B_{\max}} = \frac{F \cdot \frac{1}{2} B_{\max}}{\frac{1}{2} B_{\max}} = F \quad (2),$$

d.h. die Dissoziationskonstante entspricht der Konzentration des Hormons, bei der die Hälfte aller Rezeptoren mit dem Hormon besetzt sind ( $K_d = \frac{1}{2} B_{\max}$ ).

Da beide Parameter ( $B_{\max}$  und  $K_d$ ) aus der Sättigungskurve nur recht ungenau abzulesen sind, wurde zu exakten Bestimmung die Methode des Scatchardplots angewendet.

## 2.7.3 Darstellung nach Scatchardplot

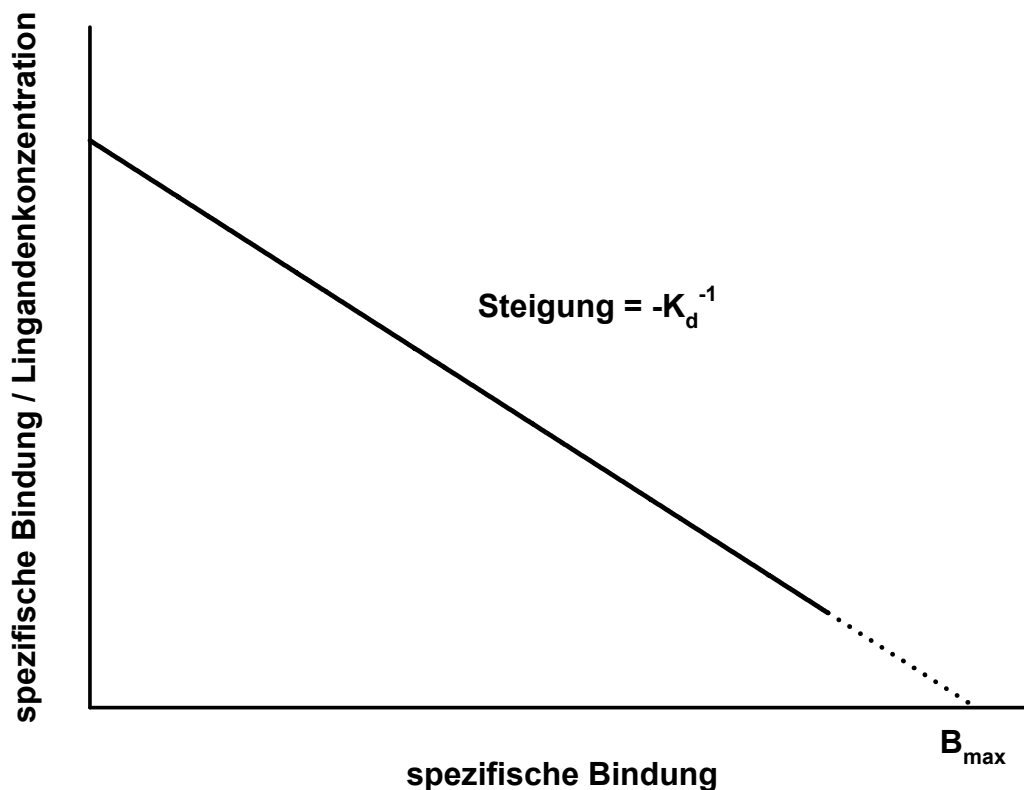


Abbildung 10: Schema eines Scatchard Plots.

Scatchard (1949) stellte eine Gleichung zur linearen Transformation der Bindungsdaten auf, die eine graphische Ermittlung derselben zulässt. Im so genannten „Scatchard-Plot“, der sehr oft angewendet wird, um Radioligandenbindungsstudien quantitativ auszuwerten, ergibt sich aus der Auftragung des Quotienten aus spezifisch gebundenem und freiem Hormon (Ordinate) gegen spezifisch gebundenes Hormon (Abszisse) im Idealfall eine entsprechende Gerade mit negativer Steigung. Die Steigung entspricht dem negativen Kehrwert von  $K_d$  und der Schnittpunkt mit der X-Achse ist  $B_{\max}$ .

Die Voraussetzung für einen linearen Verlauf im Scatchard-Plot ist, dass der Ligand sich an nur *einen* Rezeptor mit einer *konstanten* Affinität bindet, so dass keine Kooperativitätsphänomene auftreten ( $K_d$  bleibt konstant).

Allgemein bleibt festzuhalten, dass die bestimmten  $B_{\max}$  und  $K_d$  nur apparente



Größen sind, da die Zelle eine „black box“ darstellt und man nicht weiß, welche Hormonmenge tatsächlich am Rezeptor wirkt.

### 2.7.4 Protokoll

HeLa-Zellen wurden in 12-Well-Platten ausplattiert und bei Erreichen der 70%-igen Konfluenz für ca. 16 Stunden auf RPMI-Medium mit 0,5% FCS, 0,02 M NaOH, 0,01 mol/l HEPES und 0,075% NaHCO<sub>3</sub> gesetzt. Von den THP-1-Zellen wurden jeweils ca.  $1 \cdot 10^6$  Zellen je 12er Well ausgesät.

Beide Zelllinien wurden 4 bzw. 24 Stunden mit 10 nmol/l RLX stimuliert, wonach das Medium durch frisches ersetzt wurde. Nun wurden die HeLa-Zellen für zwei Stunden und die THP-1-Zellen für eine Stunde bei 37°C mit dem tritiierten Dexamethason inkubiert.

Im Anschluss wurden die Zellen fünfmal mit kaltem PBS gewaschen und mit 100-200 µl 100 nmol/l Natronlauge lysiert. Das Zelllysat wurde nach Zusatz von jeweils 2 ml Szintillations-Cocktail im Scintillationszähler vermessen.

## 2.8 Zytokin-Messungen

### 2.8.1 Durchführung

Zur Induktion einer Entzündungsantwort wurden die Makrophagen mit Lipopolysacchariden stimuliert. Diese Endotoxine kommen in der äußeren Membran der Zellwände gramnegativer Bakterien vor und sind potente Pyrogene. Eine der wichtigsten Folgereaktionen ist die Produktion von Zytokinen durch Makrophagen. Diese Immunantwort kann durch Inkubation mit anti-inflammatorischen Steroiden (z.B. Dexamethason) gehemmt werden. RU-486 ist ein Progesteron- und Glukokortikoidrezeptor-Antagonist, der so die entzündungshemmende Wirkung von Rezeptor-Liganden aufheben kann.

Als Parameter für die Stärke der Aktivierung der Entzündungskaskade wurden die TNF $\alpha$ -Spiegel im Überstand der Zellen mittels ELISA bestimmt.

### 2.8.2 Prinzip ELISA

Enzymimmunoassay (EIA) ist die Bezeichnung für eine sowohl enzymatische als auch immunchemische, hochsensitive und spezifische Analysemethode zur Bestimmung von Antigenen, Antikörpern und Haptenen. Meist bedient man sich dabei der Festphasen-Technik des ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), wo das zu quantifizierende Antigen über einen so genannten „capture antibody“ an eine feste Phase gebunden wird (meist die Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte). Durch Waschen entfernt man die nicht gebundenen Antigene und gibt einen Antigen-spezifischen Erst-Antikörper hinzu, wäscht erneut und quantifiziert die Menge des Antigens durch Zugabe eines markierten Zweit-Antikörpers. Die untere Nachweisgrenze des verwendeten Systems liegt bei 5 pg/ ml.

Die Versuche wurden mit dem DuoSet-ELISA Development System von R&D Systems durchgeführt. Dieses System bedient sich des Biotin-Streptavidin-Systems. An das mit einem TNF $\alpha$ -spezifischen Antikörper gekoppelte Biotin bindet nicht-kovalent das mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) markierte Streptavidin mit hoher Affinität. Als Substrat für die HRP dient Wasserstoffperoxyd (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Tetramethylbenzidin (TMB). Es entsteht ein blauer Farbstoff. Durch Zugabe von Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wird die Reaktion gestoppt und der Farbstoff von blau in gelb überführt. Die Messung der Adsorption erfolgte bei 450 nm.

### 2.8.3 Zellstimulation

Je Vertiefung einer 24-Well-Platte wurden ca.  $3 \cdot 10^5$  THP-1-Suspensionszellen in 1,5 ml ATCC Medium ausplattiert. Um die Differenzierung zu Makrophagen auszulösen, wurde direkt im Anschluss mit 6  $\mu$ l Phorbolmyristataacetat (PMA, 20 ng/ ml; Sigma) stimuliert.

Nach 72 Stunden wurden die nun adhärennten Makrophagen dreimal mit ATCC-Medium gewaschen, mit 1,5 ml frischem ATCC-Medium bedeckt und 24 Stunden ruhen gelassen. Eine Stunde vor Stimulationsbeginn wurden die Zellen auf ATCC-Medium mit nur 1% FCS gesetzt.

Um Einflüsse durch im Medium enthaltene Steroide auszuschließen, wurden die Versuche mit phenolrot- und steroidfreiem Medium wiederholt. Zur Entfernung der

Steroide wurde das Medium „gestrippt“, d.h. 24 Stunden bei 4°C mit Aktivkohle inkubiert und anschließend zentrifugiert und filtriert.

Da die Kultur in steroidfreiem Medium einen relativ starken Stressor für die Zelle darstellt, wurde nicht ausschließlich in „gestripptem“ Medium gearbeitet..

### 2.8.4 Stimulanzen

- Lipopolysaccharide (LPS) aus *Salmonella abortus equi* Sigma
- Dexamethason Sigma
- Ethanol (Lösungsmittel für Dexa) Merck
- Relaxin Immundiagnostik
- RU-486 (Mifepristone) Biomol

### 2.8.5 Materialien ELISA

- TNF $\alpha$  Capture An- 4  $\mu$ g/ ml Maus anti-human AK in PBS  
tibody R&D Systems
- TNF $\alpha$  Detection 300 ng/ ml in 1% ATCC Medium  
Antibody R&D Systems
- Wasch-Puffer 0,05% Tween 20 in PBS  
pH 7,2-7,4 R&D Systems
- TNF $\alpha$  Standard 70 ng/ ml R&D Systems
- BSA Rinderalbumin Fraktion V, proteasefrei Sigma
- Block-Puffer 1% BSA, 5% Sacharose in PBS mit  
0,05% NaN<sub>3</sub>
- Substrat-Lösung 1 zu 1 Mischung von Color Reagent A  
(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Color Reagent B (TMB) R&D Systems
- Stopp-Lösung 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> R&D Systems
- Mikrotiterplatte Nunc-Immuno-Platte mit 96 Vertiefun- NUNC

	gen (Wells) und MaxiSorp-Oberfläche	
• Software	WinRead 2.10	anthos labtec
• Photometer	Absorptionsphotometer „ht III“	anthos labtec

### 2.8.6 Protokoll ELISA

Als erstes wurde eine Zellkulturplatte mit dem Capture-Antikörper beschichtet. Dazu wurden 100 µl der Capture-AB-Lösung je 96-well pipettiert. Die Platte wurde versiegelt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wells dreimal mit jeweils 400 µl Waschpuffer gewaschen und im Anschluss mit 300 µl Block-Puffer beschichtet. Nach mindestens einer Stunde bei Raumtemperatur wurde erneut dreimal gewaschen. Die Proben wurden mit 1%-igem ATCC-Medium verdünnt, so dass die Zytokinpiegel im geeichten Messbereich lagen. Jeweils 100 µl wurden in die Vertiefungen pipettiert. Nach 2 Stunden wurde wieder dreimal gewaschen und 100 µl Detektionslösung hinzugegeben. Die versiegelte Zellkulturplatte wurde erneut 2 Stunden bei RT inkubiert und anschließend dreifach gewaschen. Nun wurden 100 µl des Streptavidin-Peroxidase-Komplex hinzugegeben und 20 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde dreimal gewaschen und 100 µl der Substratlösung hinzugegeben. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung beendet und sofort die optische Dichte im Photometer bei 450 nm bestimmt. Um optische Fehler in der Platte zu korrigieren, wurden die Messwerte bei 570 nm abgezogen. Für jede Platte wurde eine eigene Standardkurve erzeugt. Alle Standards und Proben wurden als Doppelwerte bestimmt.

## 2.9 Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten wurden mit der Software SigmaStat (Version 2.0, Jandel Corporation © 1992-1995) statistisch ausgewertet. Die Diagramme des Ergebnisteils wurden mit der Software SigmaPlot (Version 8.0, SPSS Inc. © 1986-2001) erstellt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art von  $p < 0,05$  wird als signifikant angesehen. Die angegebenen Abweichungen entsprechen dem Standardfehler der Mittelwerte (SEM).

Mit Hilfe einer nichtparametrischen eindimensionalen Kruskal-Wallis-Varianzanalyse (one-way ANOVA) wurden folgende Experimente ausgewertet: Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  in THP-1-Zellen (4.1.), GRE-Luziferase-Assay (4.4.),  $K_d$  und  $B_{max}$  im  $^3\text{H}$ -Dexamethason-Assay (4.7.) (Bortz et al., 1990).

Nachfolgende Versuche wurden mit einer nichtparametrischen zweidimensionalen Varianzanalyse (two-way ANOVA) analysiert: Regulation der GR-mRNA (4.5.) und des GR-Proteins (4.6.),  $^3\text{H}$ -Dexamethason-Sättigungsbindung im Gesamtzellassay (4.7.) (Bortz et al., 1990).

In jedem Fall wurde nach einem globalen Test ein multipler Vergleich mit Bonferroni-Holm-Adjustierung von P durchgeführt (Holm, 1979).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 TNF $\alpha$ -Expression

Zunächst erfolgte die funktionelle Prüfung der Hypothese, dass Relaxin einen immunmodulatorischen Effekt, hat am Beispiel der Zytokinproduktion in THP-1-Zellen. Die Zellen wurden mit LPS zur Auslösung einer Inflammationsantwort behandelt. Als Parameter für deren Stärke wurde der TNF $\alpha$ -Spiegel mittels ELISA bestimmt.

In Konzentrationsreihen über 8 h und 48 h konnte die Konzentration von 100 ng/ml LPS als optimal zur Stimulierung der Ausschüttung von TNF $\alpha$  bestimmt werden (siehe Abbildung 11).

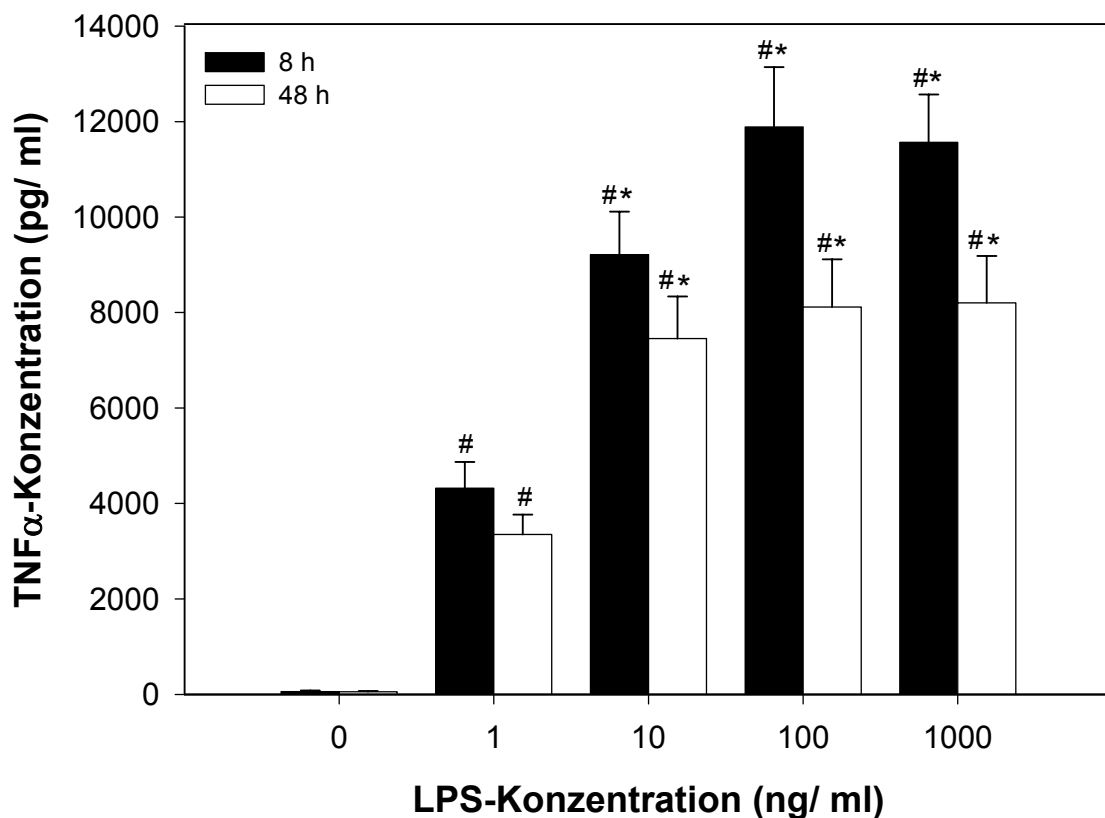


Abbildung 11: Sekretion von TNF $\alpha$  durch THP-1-Zellen in Abhängigkeit von der LPS-Konzentration. Die Stimulation erfolgte über 8 h bzw. 48 h (n = 3). Die TNF $\alpha$ -Spiegel wurden mittels ELISA bestimmt ( $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle, \*: vs. 1 ng/ml LPS).

Durch weitere Vorversuche mit Relaxin-Konzentrationen von 0,1, 1, 10 und 100 nmol/ l, konnte ein Maximaleffekt des Relaxins in THP-1-Zellen ab 10 nmol/ l festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Um die Menge des benötigten Relaxins zu reduzieren, wurde für die nachfolgenden Versuche eine Konzentration von 1 nmol/ l verwendet, welche einen mittleren Dosis-Wirkungs-Bereich repräsentiert. Dexamethason und RU-486 waren in Ethanol gelöst. Die resultierenden Lösungsmittelkonzentrationen allein hatten keinen Einfluss auf die Zellen (Daten nicht gezeigt).

Der  $\text{TNF}\alpha$ -Anstieg nach Stimulation mit LPS konnte durch Koinkubation mit 100 nmol/ l Dexamethason um 70% (8 h), 74% (24 h) und 67% (48 h) verringert werden. Die Anwesenheit von 10 nmol/ l Relaxin verringerte die Spiegel um 55% (8 h), 60% (24 h) und 51% (48 h). Dieser Effekt wurde durch den GR-Antagonisten RU-486 sowohl bei Dexamethason als auch bei Relaxin nahezu vollständig aufgehoben (siehe Abbildung 12, Abbildung 13 und Abbildung 14).

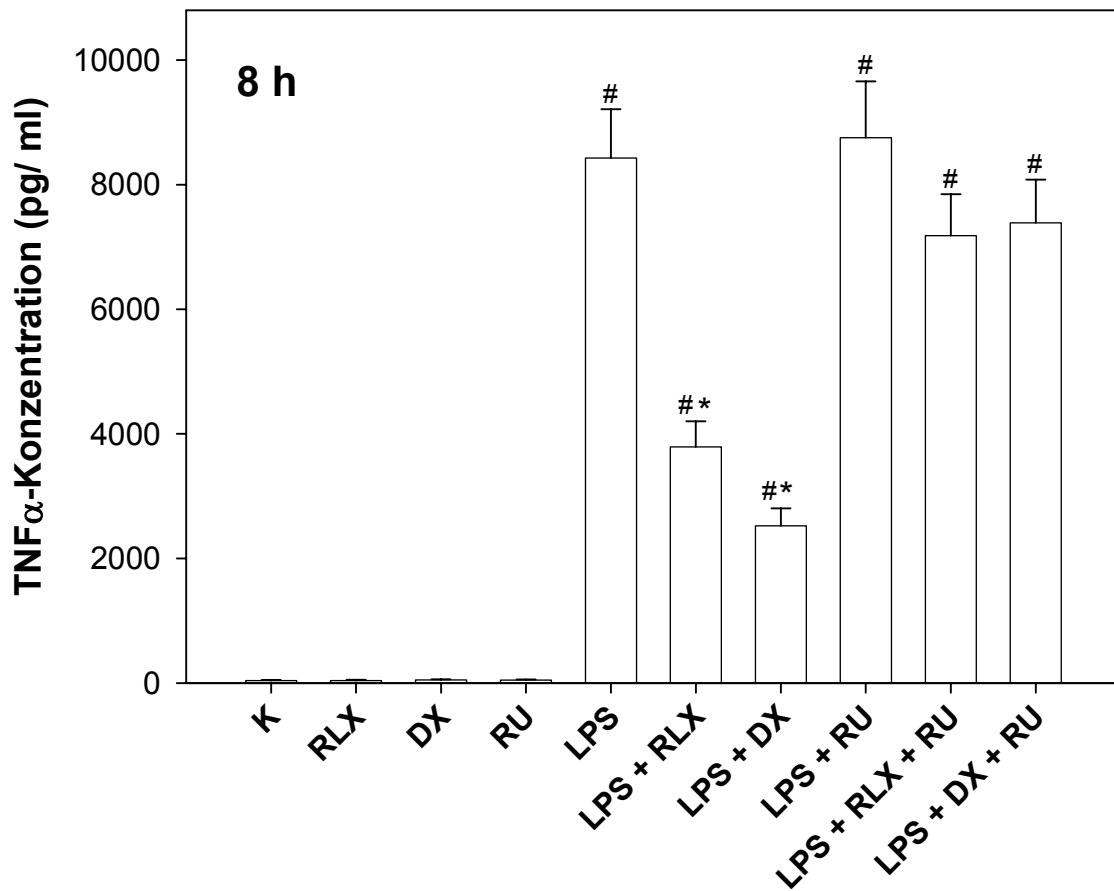


Abbildung 12: Sekretion von TNF $\alpha$  durch THP-1-Zellen nach 8-stündiger LPS-Stimulation. Einfluss von Relaxin, Dexamethason und RU-486 (n = 10; K: Kontrolle; LPS: 10 nmol/l Lipopolysaccharide; RLX: 1 nmol/l Relaxin; DX: 100 nmol/l Dexamethason; RU: 0,5  $\mu$ mol/l RU-486,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle, \*: vs. LPS).



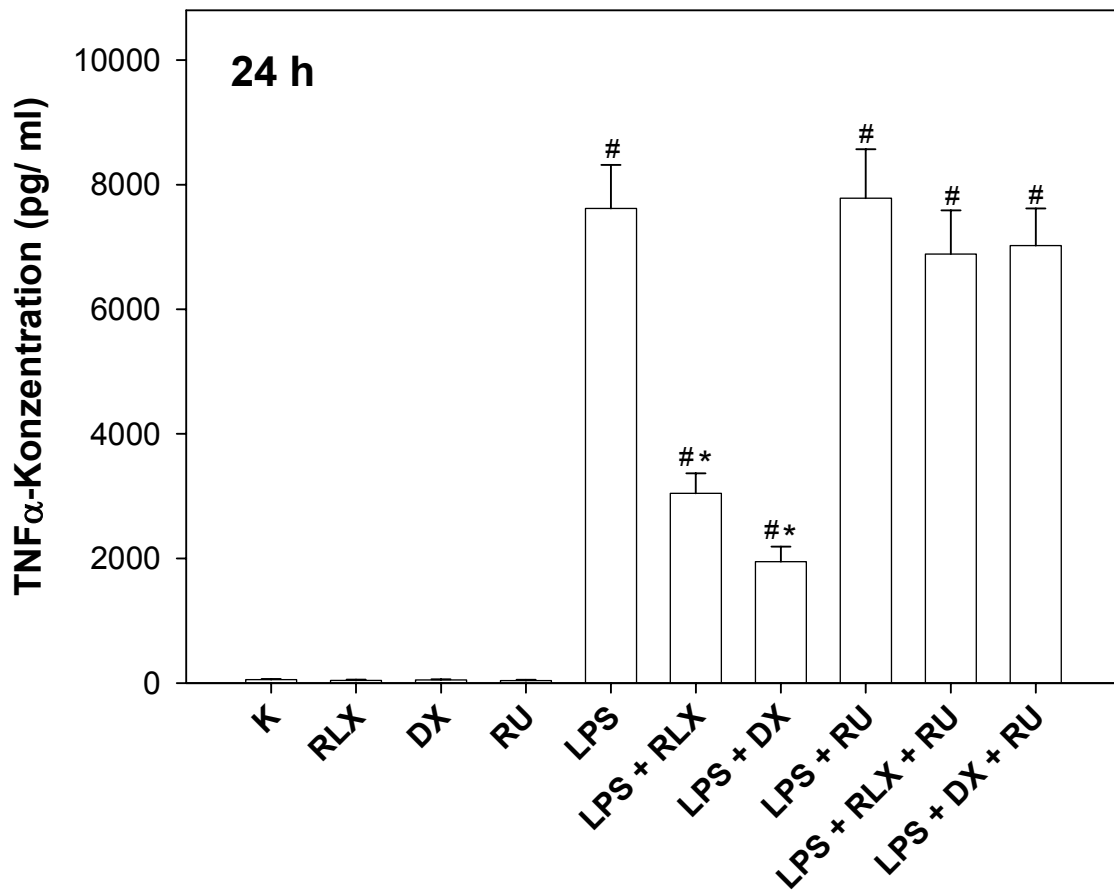


Abbildung 13: Sekretion von TNF $\alpha$  durch THP-1-Zellen nach 24-stündiger LPS-Stimulation. Einfluss von Relaxin, Dexamethason und RU-486 (n = 10; K: Kontrolle; LPS: 10 nmol/l Lipopolysaccharide; RLX: 1 nmol/l Relaxin; DX: 100 nmol/l Dexamethason; RU: 0,5  $\mu$ mol/l RU-486,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle, \*: vs. LPS).

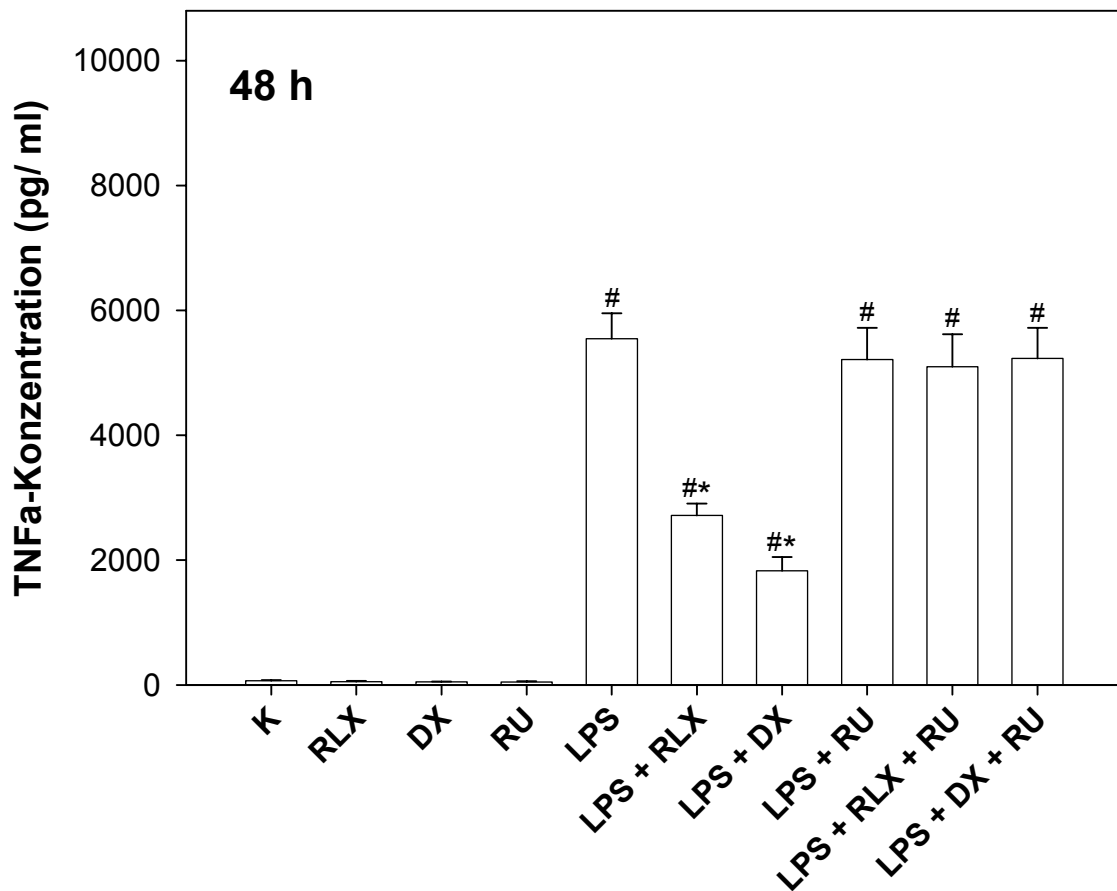


Abbildung 14: Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  durch THP-1-Zellen nach 48-stündiger LPS-Stimulation. Einfluss von Relaxin, Dexamethason und RU-486 ( $n = 10$ ; K: Kontrolle; LPS: 10 nmol/l Lipopolysaccharide; RLX: 1 nmol/l Relaxin; DX: 100 nmol/l Dexamethason; RU: 0,5  $\mu\text{mol/l}$  RU-486,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle, \*: vs. LPS).

Um Wechselwirkungen mit im Medium vorhandenen endogenen Steroidhormonen auszuschließen, wurden die Versuche in steroidfreiem („gestripptem“) Medium wiederholt. Dort zeigten sich gleiche Ergebnisse: eine deutliche Erniedrigung des  $\text{TNF}\alpha$ -Spiegels durch Dexamethason und Relaxin und eine Neutralisierung dieses Effektes durch den GR-Antagonisten (siehe Abbildung 15, Abbildung 16 und Abbildung 17). Da die Kultivierung in steroidfreiem Medium keine optimalen Bedingungen für die Zellen darstellt, und sich morphologische Veränderungen der Zellen wie Vakuolenbildung und zum Teil auch Ablösung zeigen, war es sinnvoll, die Versuche nicht bereits primär in steroidfreiem Medium durchzuführen.

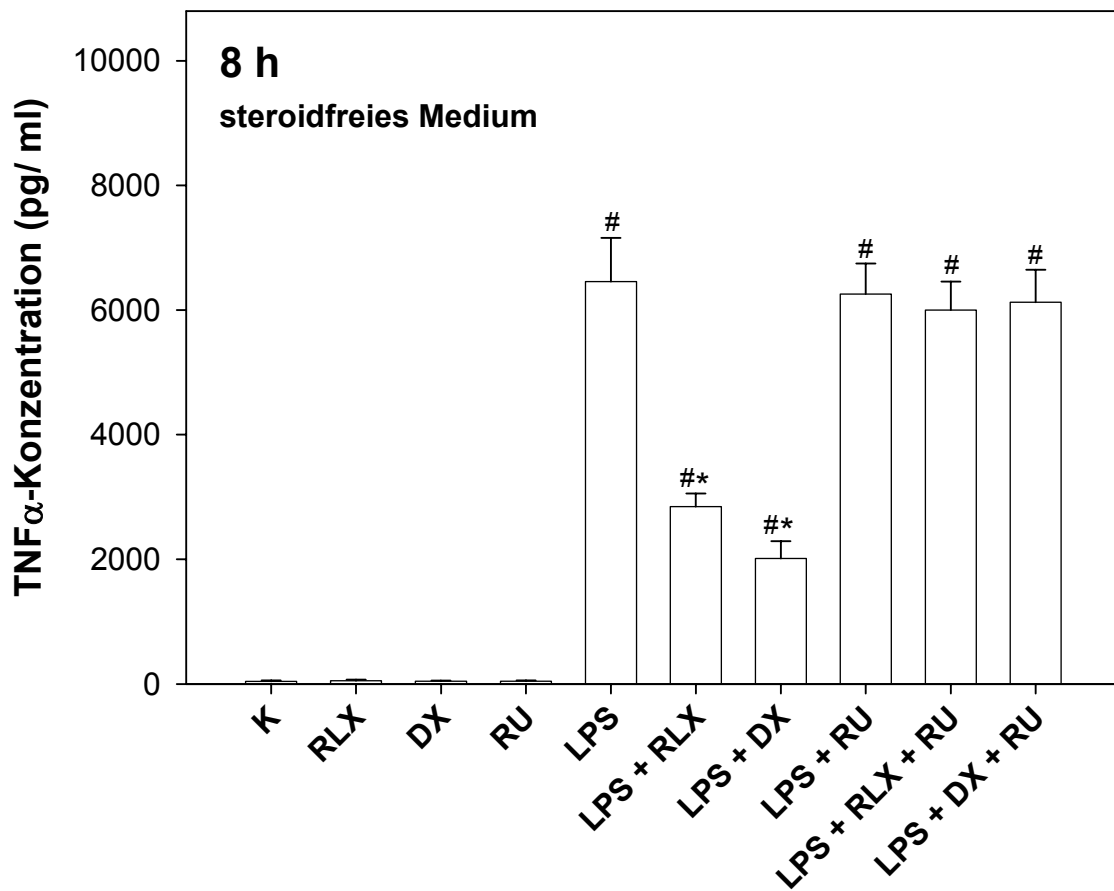


Abbildung 15: Sekretion von TNF $\alpha$  durch THP-1-Zellen nach 8-stündiger LPS-Stimulation in steroidfreiem Medium. Einfluss von Relaxin, Dexamethason und RU-486 (n = 10; K: Kontrolle; LPS: 10 nmol/ l Lipopolysaccharide; RLX: 1 nmol/ l Relaxin; DX: 100 nmol/ l Dexamethason; RU: 0,5  $\mu$ mol/ l RU-486,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle, \*: vs. LPS).

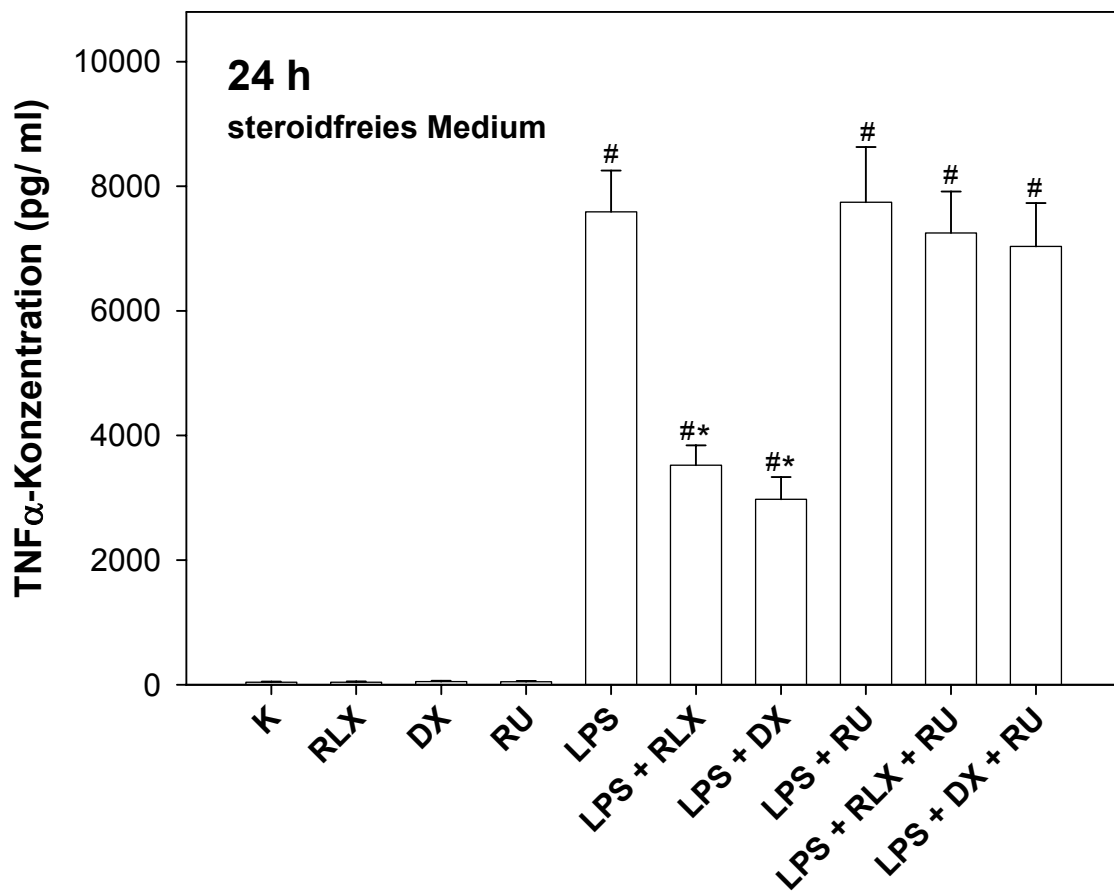


Abbildung 16: Sekretion von TNF $\alpha$  durch THP-1-Zellen nach 24-stündiger LPS-Stimulation in steroidfreiem Medium. Einfluss von Relaxin, Dexamethason und RU-486 (n = 10; K: Kontrolle; LPS: 10 nmol/ l Lipopolysaccharide; RLX: 1 nmol/ l Relaxin; DX: 100 nmol/ l Dexamethason; RU: 0,5  $\mu$ mol/ l RU-486,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle, \*: vs. LPS).

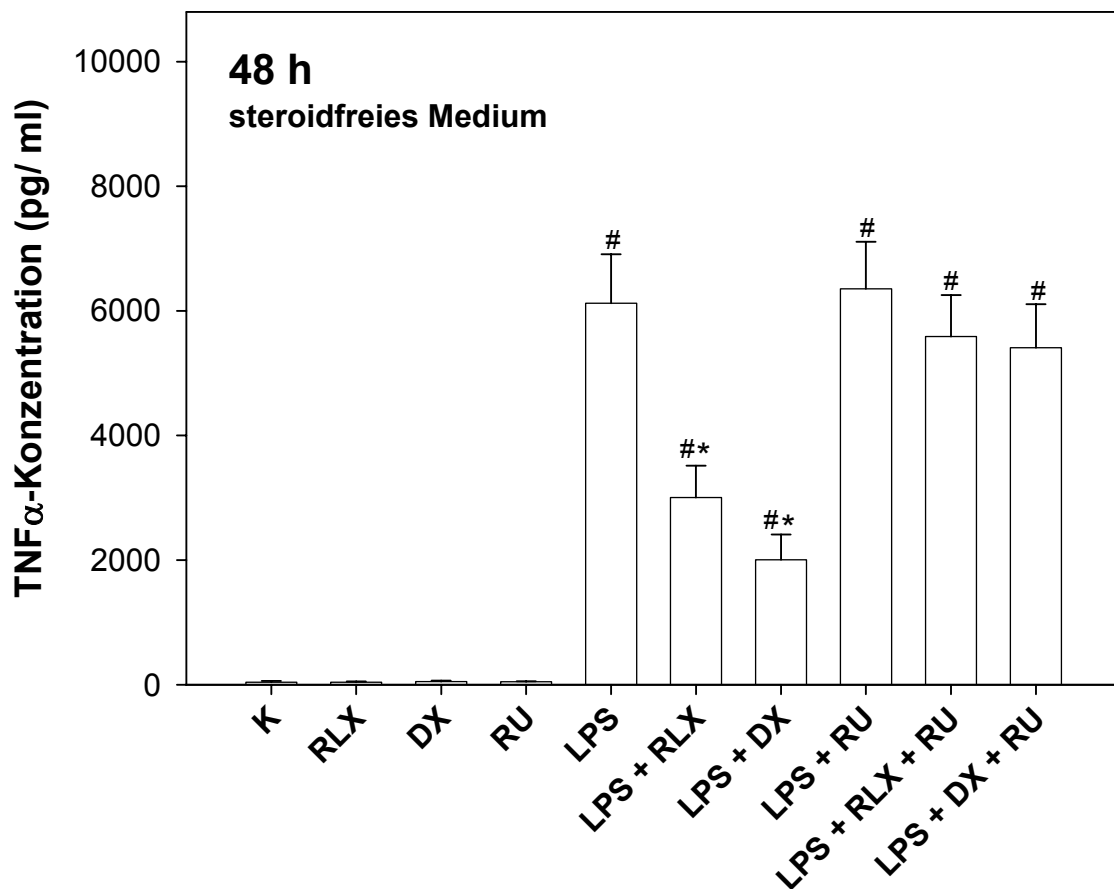


Abbildung 17: Sekretion von TNF $\alpha$  durch THP-1-Zellen nach 48-stündiger LPS-Stimulation in steroidfreiem Medium. Einfluss von Relaxin, Dexamethason und RU-486 (n = 10; K: Kontrolle; LPS: 10 nmol/ l Lipopolysaccharide; RLX: 1 nmol/ l Relaxin; DX: 100 nmol/ l Dexamethason; RU: 0,5  $\mu$ mol/ l RU-486,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle, \*: vs. LPS).

Diese Befunde zeigten deutlich einen die Ausschüttung von TNF $\alpha$ -hemmenden Effekt des Relaxins, der analog zum Effekt von Dexamethason durch einen GR-Antagonisten aufgehoben werden konnte. Diese Experimente deuteten daher auf eine Wirkung des Relaxins über den Glukokortikoidrezeptor hin. Deshalb schlossen sich Untersuchungen zur Wechselwirkung von Relaxin mit Glukokortikoidrezeptor an.

### 3.2 Koimmunpräzipitation

Bei der Präzipitierung mit Glukokortikoidrezeptor-Antikörpern und folgender Auftrennung des Präzipitates mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) konnten regelmäßig Relaxin-Banden detektiert werden. Für die mit dem Glukokortikoidrezeptor assoziierten Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90 wurden ebenfalls durchgängig deutliche Banden festgestellt (siehe Abbildung 18a). Das Verfahren der Koimmunpräzipitation ist quantitativ nur sehr eingeschränkt zu beurteilen, jedoch scheint eine Inkubation mit Relaxin für 30 Minuten die Menge des mit dem Glukokortikoidrezeptor kopräzipitierten Relaxins zu erhöhen.

Die Koimmunpräzipitation mit Relaxin-Antikörpern zeigte (siehe Abbildung 18b) eine Bande für den Glukokortikoidrezeptor, die nach Relaxin-Behandlung stärker ausgeprägt war.

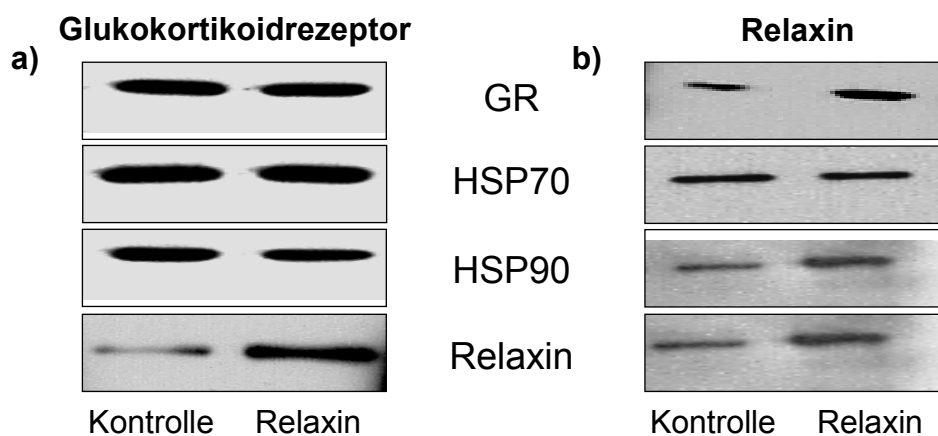


Abbildung 18: Immunpräzipitation aus HeLa-Zelllysate (Relaxin: 10 nmol/l | Relaxin über 30 Minuten) mit AK gegen a) den GR und b) Relaxin sowie nachfolgende Auftrennung der Präzipitate und Analyse der Kopräzipitation im Western Blot (repräsentatives Beispiel von n = 3 Versuchen).

Diese Befunde zeigen, dass Relaxin an den Glukokortikoidrezeptor selbst oder an mit dem Rezeptor assoziierte Proteine bindet.

### 3.3 Verteilung von Glukokortikoidrezeptoren und Relaxin in Zytoplasma und Zellkern

Um differenziertere Befunde zur Verteilung des Glukokortikoidrezeptors und des Relaxins im Zytoplasma und im Zellkern zu erhalten, wurde eine Zeitkinetik mit HeLa-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden bei der Lyse in Kern- und Zytoplasmaextrakte aufgetrennt. Die Extrakte wurden in Western Blots mit einem GR- bzw. Relaxin-Antikörper verarbeitet.

#### 3.3.1 Verteilung des Glukokortikoidrezeptors

Dexamethason führte nach 30 Minuten zu einem massiven Glukokortikoidrezeptor-Anstieg im Kern, die Rezeptormenge im Zytoplasma hingegen änderte sich kaum.

Nach Relaxin-Stimulation stieg die Glukokortikoidrezeptor-Menge im Kern ebenfalls nach 30 Minuten an und sank dann unter den Ausgangswert. Im Zytoplasma bewirkte Relaxin bereits nach 30 Minuten einen Anstieg der Rezeptor-Proteinmenge, der sich nach einer und vier Stunden noch verstärkte (siehe Abbildung 19).

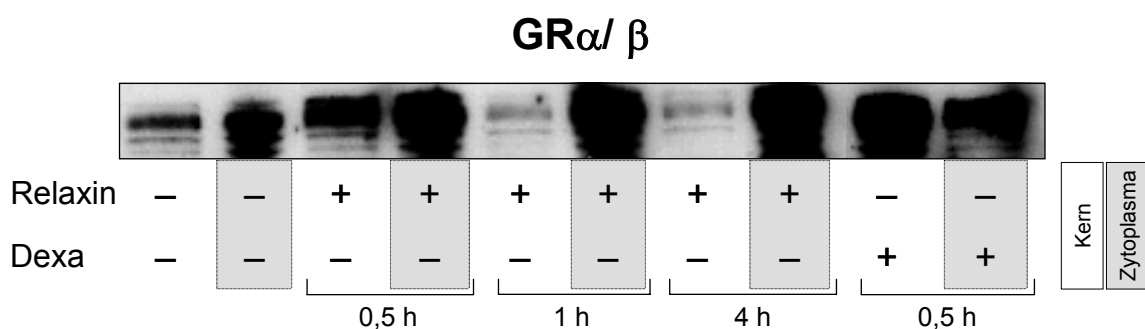


Abbildung 19: Zeitkinetik der Glukokortikoidrezeptorprotein-Menge in Kern-/ Zytoplasmaextrakten nach Stimulation mit 10 nmol/ l Relaxin und 100 nmol/ l Dexamethason (repräsentatives Beispiel von n = 3 Versuchen).

### 3.3.2 Verteilung des Relaxins

Zeitgleich mit dem Ansteigen des Glukokortikoidrezeptors im Kern 30 Minuten nach Stimulation mit Relaxin, findet man dort auch eine Erhöhung des Relaxinspiegels. Danach fällt die Relaxinmenge im Kern wieder auf ihr Ausgangsniveau zurück. Im Zytoplasma bleibt der Relaxinspiegel in etwa gleich (siehe Abbildung 20).

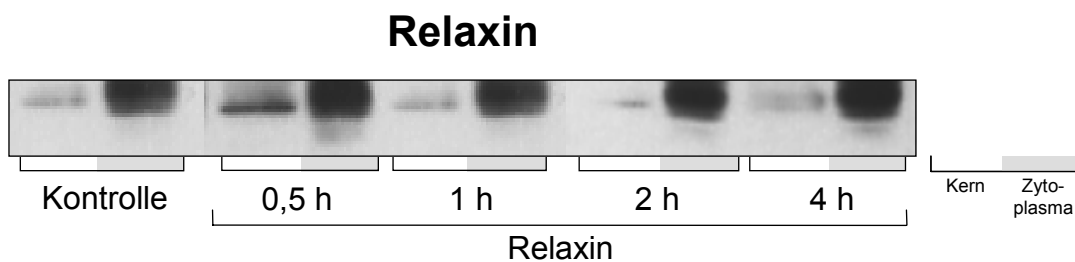


Abbildung 20: Zeitkinetik der Relaxinprotein-Menge in Kern-/ Zytoplasmaextrakten nach Stimulation mit 10 nmol/ l Relaxin (repräsentatives Beispiel von n = 3 Versuchen).

### 3.4 Bestimmung der Luziferaseaktivität als Marker für die Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob die Bindung des Relaxins an den Glukokortikoidrezeptor-Komplex auch zu seiner Aktivierung führt, wurden HeLa- und THP-1-Zellen transient mit einem GRE-luc Vektor transfiziert. Dadurch führte jede Stimulation der „glucocorticoid response elements“ der DNA durch den aktivierten Glukokortikoidrezeptor zu einer verstärkten Expression der Luziferase.

Aufgrund der Zeit- und Konzentrationskinetiken (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22) wurden für die folgenden Untersuchungen eine Expositionsdauer von 4 Stunden und eine Relaxinkonzentration von 10 nmol/ l gewählt.



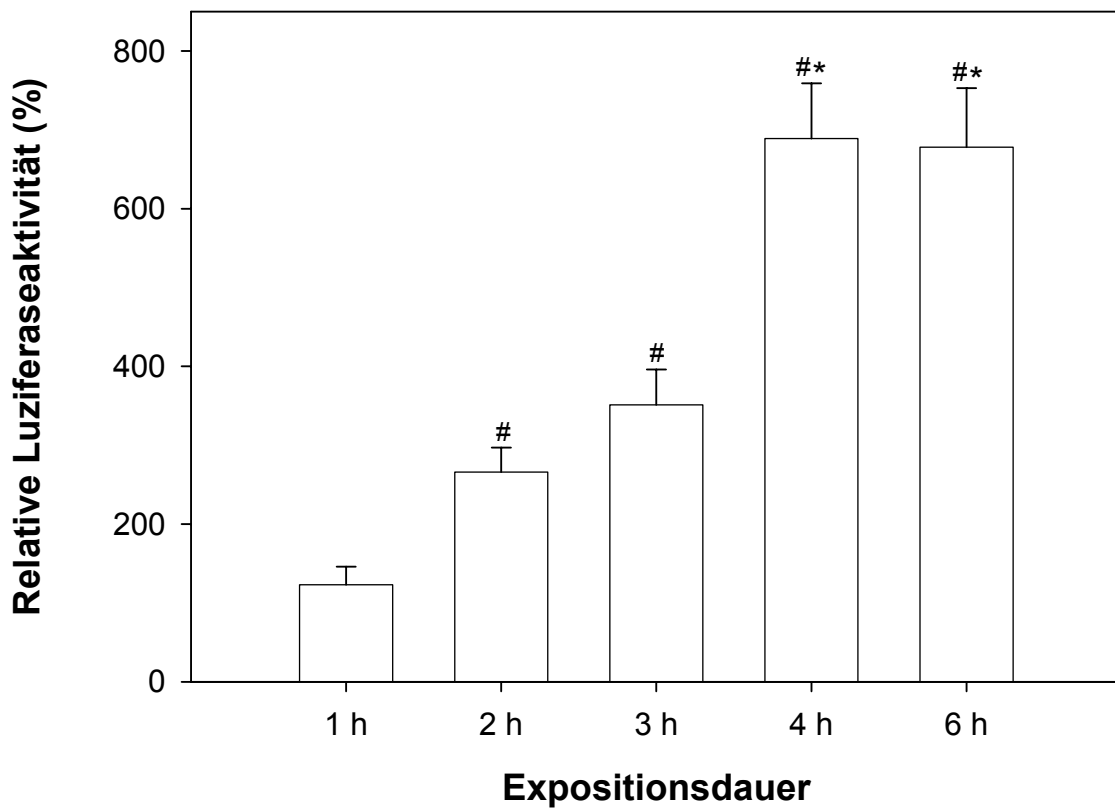


Abbildung 21: Zeitkinetik der Luziferaseaktivität in mit GRE-luc transient transfizierten HeLa-Zellen (n = 3; Relaxinkonzentration 10 nmol/l; 100% = ohne Relaxinexposition,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle, \*: vs. 3 h).

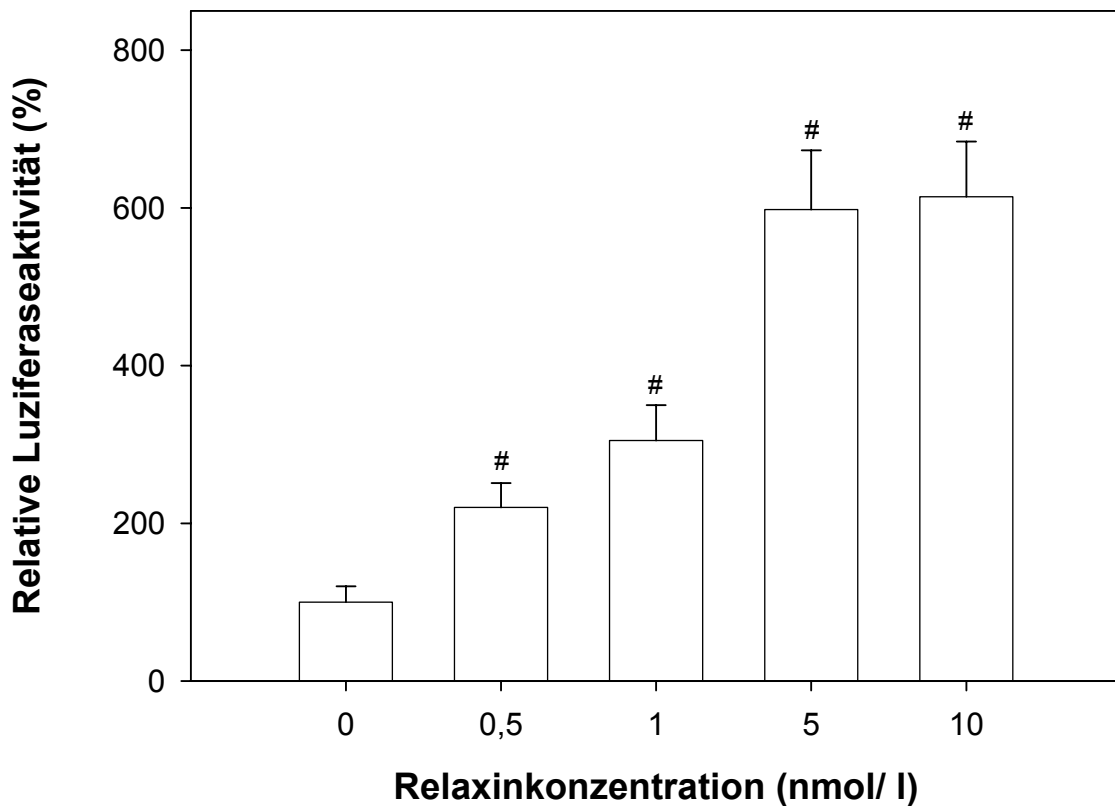


Abbildung 22: Einfluss der Relaxinkonzentration auf die Luziferase-Aktivität in mit GRE-luc transient transfizierten HeLa-Zellen (n = 3; Expositionsdauer 4 Stunden,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle).

Die Luziferase-Aktivität in HeLa-Zellen erhöhte sich nach vierstündiger Inkubation mit 100 nmol/l Dexamethason um den Faktor 11, 10 nmol/l Relaxin bewirkte eine Steigerung um den Faktor 7. Die Koinkubation mit 0,5  $\mu\text{mol/l}$  RU-486 verringerte die Aktivitätszunahme um 61% bei Dexamethason und 29% bei Relaxin. Bei 2,5  $\mu\text{mol/l}$  RU-486 wurde konnte kein signifikanter Aktivitätsanstieg durch Dexamethason oder Relaxin mehr nachgewiesen werden (siehe Abbildung 23).

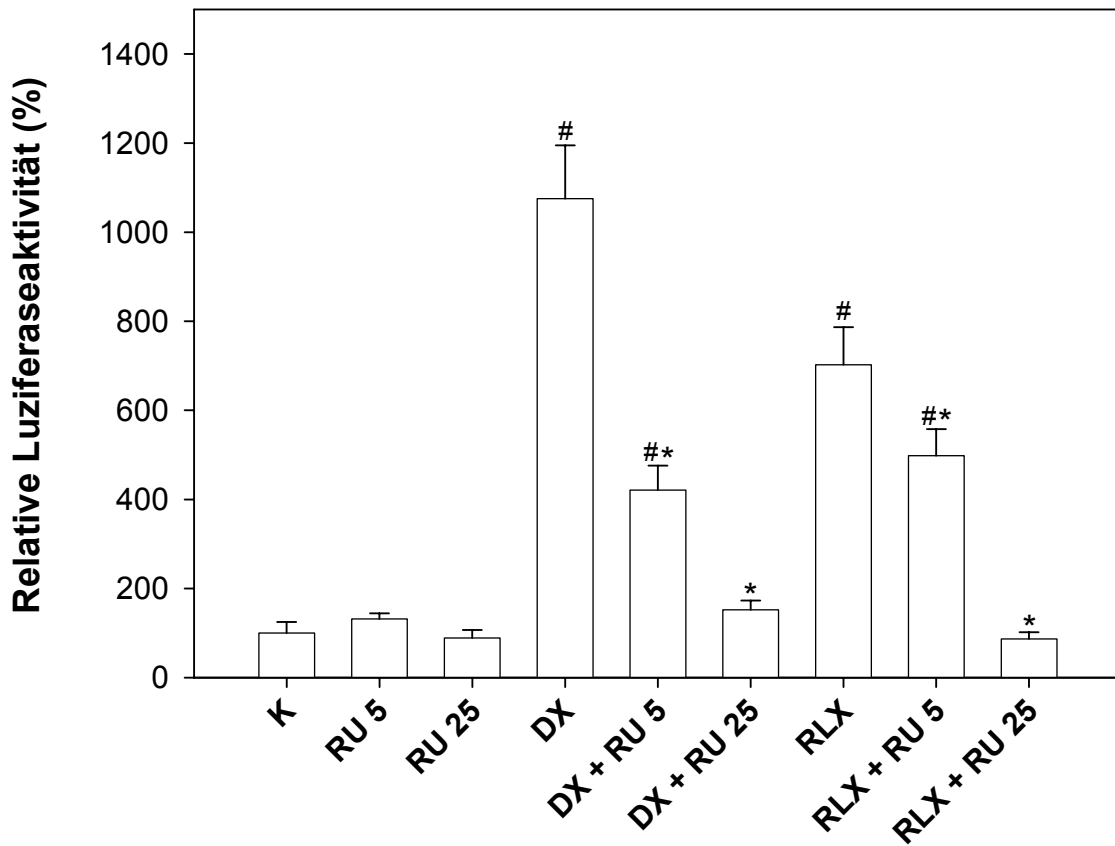


Abbildung 23: Aktivität der Luziferase in mit GRE-luc transient transfizierten HeLa-Zellen nach vierstündiger Behandlung mit Dexamethason, Relaxin und RU-486 (n = 3; K: Kontrolle; RU 5: 0,5  $\mu\text{mol/l}$  RU-486; RU 25: 2,5  $\mu\text{mol/l}$  RU-486; DX: 100 nmol/l Dexamethason,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle, \*: vs. DX bzw. RLX).

Wie aus Abbildung 24 ersichtlich ergaben die Versuche mit THP-1- Zellen ähnliche Befunde. Die Aktivitätszunahme der Luziferase nach vierstündiger Inkubation mit Dexamethason bzw. Relaxin war 8- bzw. 5-fach. Durch 0,5  $\mu\text{mol/l}$  RU-486 wurde der Anstieg um 64% bei Dexamethason und 57% bei RU-486 verringert. In der höheren Konzentration von 2,5  $\mu\text{mol/l}$  RU-486 kam es zu keiner signifikanten Aktivitätszunahme durch Dexamethason oder Relaxin.

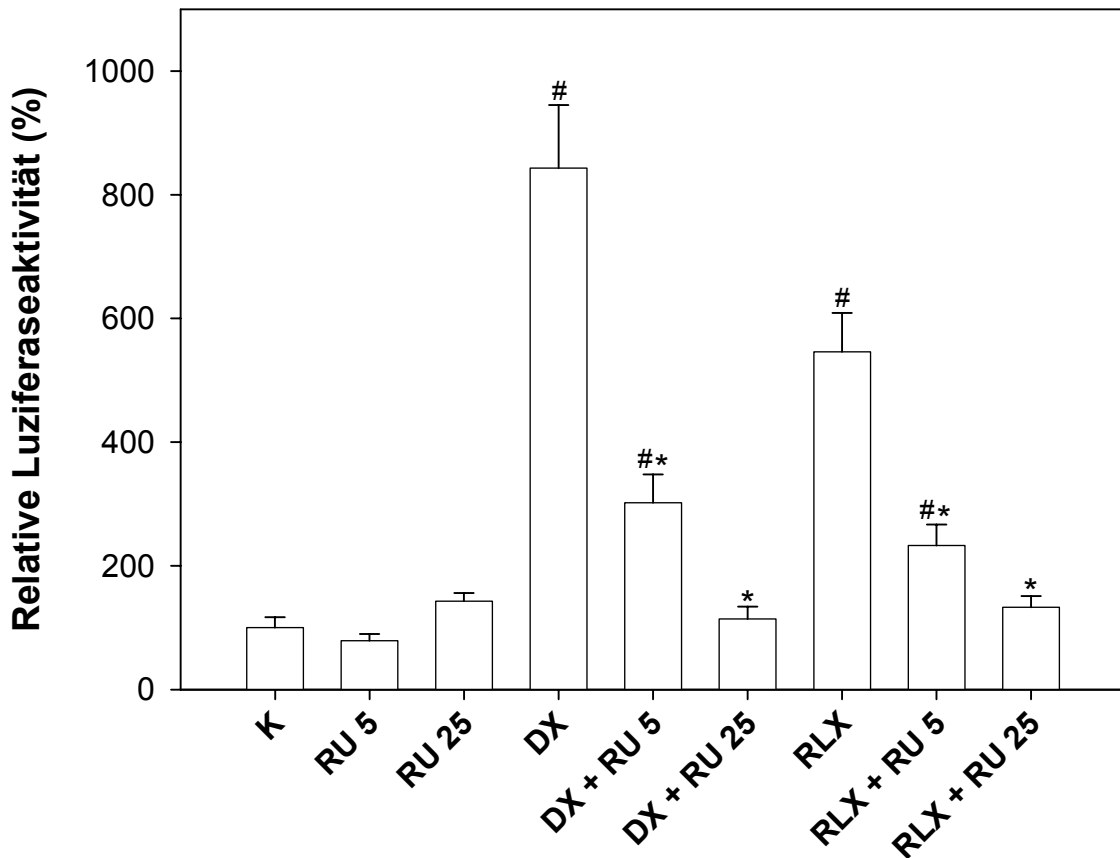


Abbildung 24: Aktivität der Luziferase in mit GRE-luc transient transfizierten THP-1-Zellen nach vierstündiger Behandlung mit Dexamethason, Relaxin und RU-486 (n = 3; K: Kontrolle; RU 5: 0,5 µmol/ l RU-486; RU 25: 2,5 µmol/ l RU-486; DX: 100 nmol/ l Dexamethason,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle, \*: vs. DX bzw. RLX).

### 3.5 Regulation des Glukokortikoid-Rezeptors durch Relaxin auf mRNA-Ebene

Nach diesen Hinweisen auf Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors durch Relaxin folgten Versuche, in denen die Beeinflussung der Rezeptor-Expression durch Relaxin untersucht wurde.

Dazu wurden HeLa- bzw. THP-1-Zellen für 0,5, 1, 2 und 4 Stunden mit 10 nmol/ l Relaxin bzw. für 6 Stunden mit 100 nmol/ l Dexamethason stimuliert und anschließend die RNA extrahiert. Um festzustellen, ob die Effekte durch Bindung an den Glukokortikoidrezeptor vermittelt sind, wurden die Untersuchungen mit 0,5 µmol/ l RU-486 wiederholt.

Repräsentative Ergebnisse (aus n = 4 Versuchen) der PCR zeigt Abbildung 25.

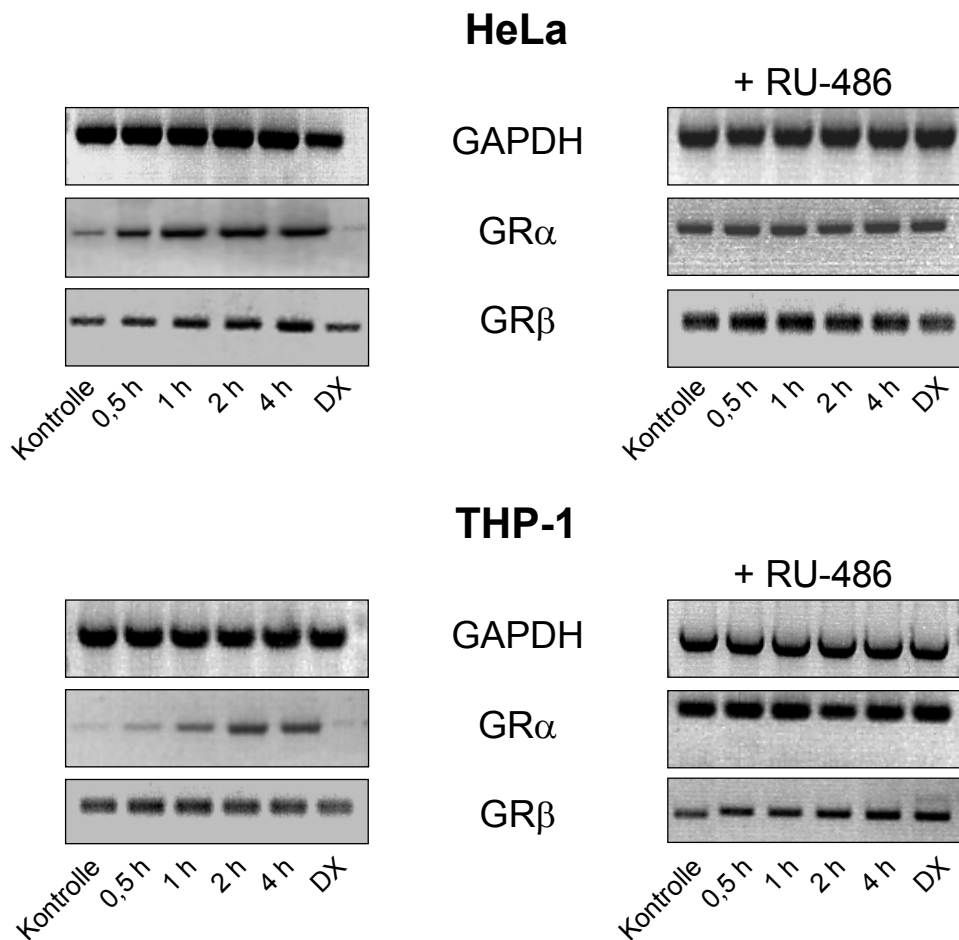


Abbildung 25: GAPDH-, GR $\alpha$ - und GR $\beta$ -mRNA-Expression in HeLa- und THP-1-Zellen. Inkubation mit 10 nmol/l Relaxin für 0,5, 1, 2 und 4 Stunden bzw. mit 100 nmol/l Dexamethason für 6 Stunden. Rechts zusätzlich mit 0,5  $\mu$ mol/l RU-486 inkubiert.

Zur Quantifizierung wurden die Banden densitometrisch ausgewertet und auf das Gen GAPDH abgeglichen.

Die sechsstündige Inkubation mit Dexamethason in HeLa-Zellen hatte eine 33%ige Abnahme der Expression zur Folge. Die Stimulation mit Relaxin führte zur signifikanten mRNA-Expressionssteigerung des GR $\alpha$  in HeLa-Zellen um 95, 145, 200 bzw. 165% nach 0,5, 1, 2 bzw. 4 Stunden (siehe Abbildung 26). Die Ko-Inkubation mit RU-486 verhinderte signifikante Expressionsänderungen.

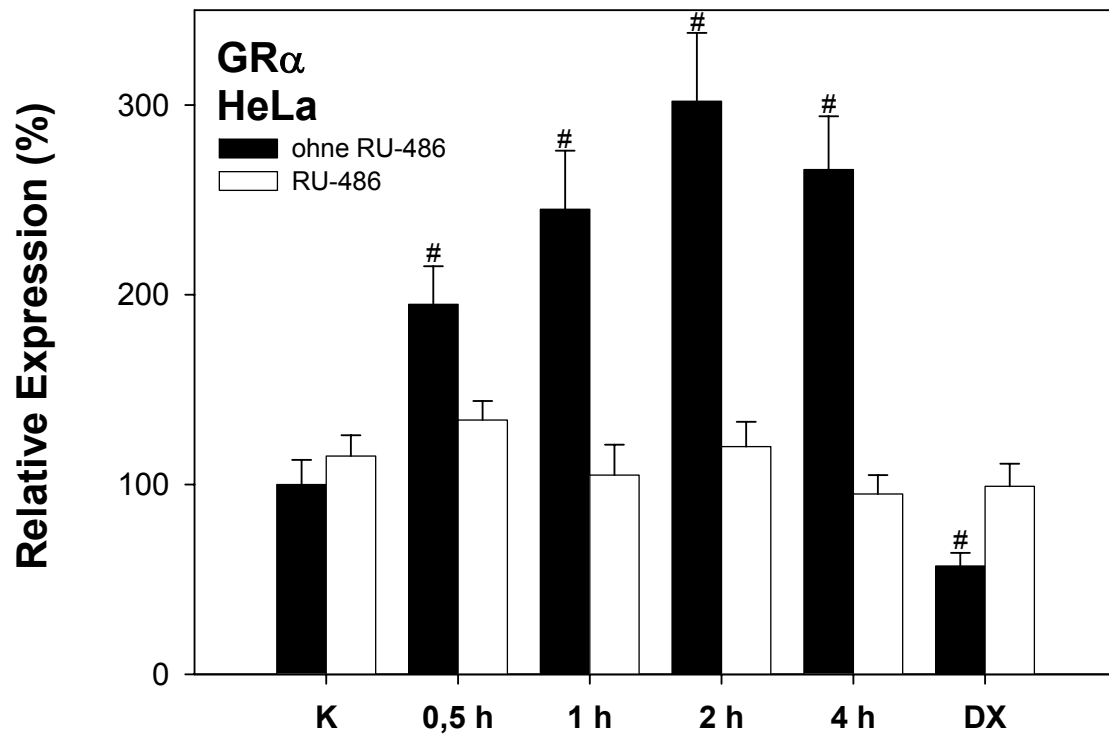


Abbildung 26: Expression der GR $\alpha$ -mRNA in HeLa-Zellen nach Stimulation mit Relaxin und RU-486 (n = 4, normiert auf GAPDH, 10 nmol/l Relaxin, 0,5  $\mu$ mol/l RU-486, DX: 100 nmol/l Dexamethason für 6 Stunden,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle).

Wie Abbildung 27 zeigt, veränderte sich die mRNA des GR $\beta$  nach Stimulierung mit Dexamethason nicht. Relaxin führte zu signifikanten Erhöhungen von 85 und 110% nach 2 und 4 Stunden. Der GR-Antagonist RU-486 senkte die Effekte auf ein nichtsignifikantes Niveau.

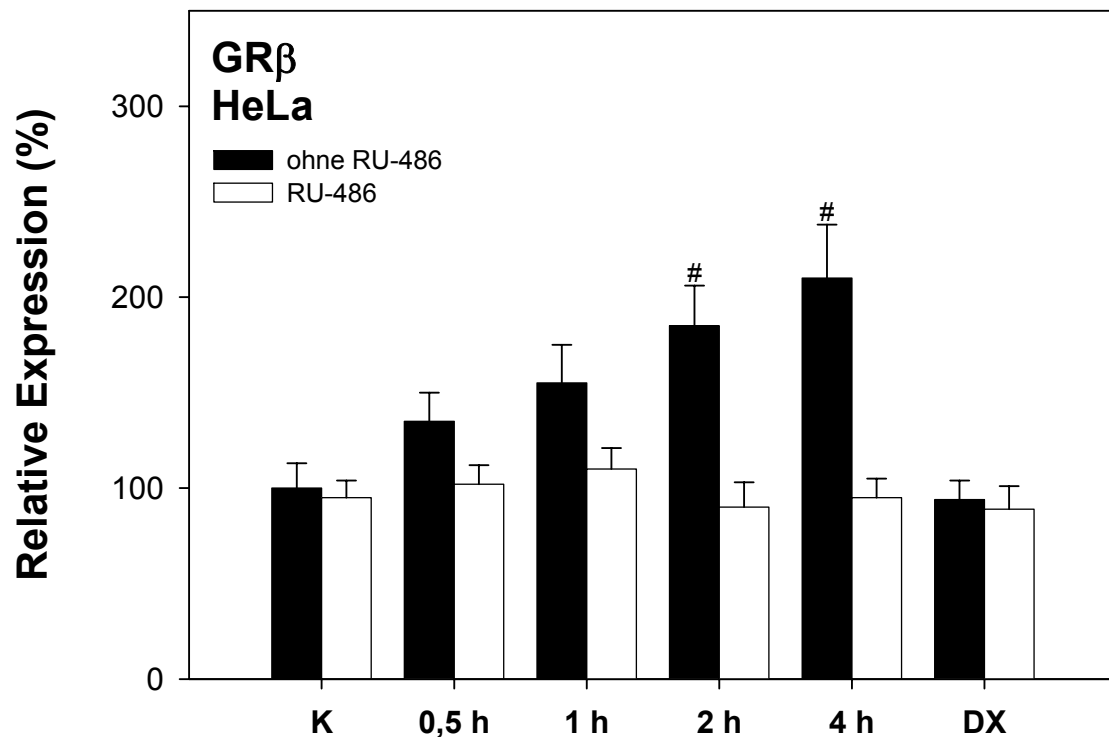


Abbildung 27: Expression der GR $\beta$ -mRNA in HeLa-Zellen nach Stimulation mit Relaxin und RU-486 (n = 4, normiert auf GAPDH, 10 nmol/ l Relaxin, 0,5  $\mu$ mol/ l RU-486, DX: 100 nmol/ l Dexamethason für 6 Stunden,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle).

In THP-1-Zellen kam es durch die Inkubation mit Dexamethason zu einer signifikanten Verringerung der GR $\alpha$ -mRNA-Expression um 50%. Relaxin hingegen erhöhte die GR $\alpha$ -mRNA-Expression. Nach 30 Minuten war der Anstieg noch nicht signifikant, nach 1, 2 und 4 Stunden jedoch waren deutliche Steigerungen um 175, 215 und 230% festzustellen (siehe Abbildung 28). Auch hier unterdrückte RU-486 eine Änderung der Rezeptor-mRNA-Expression.

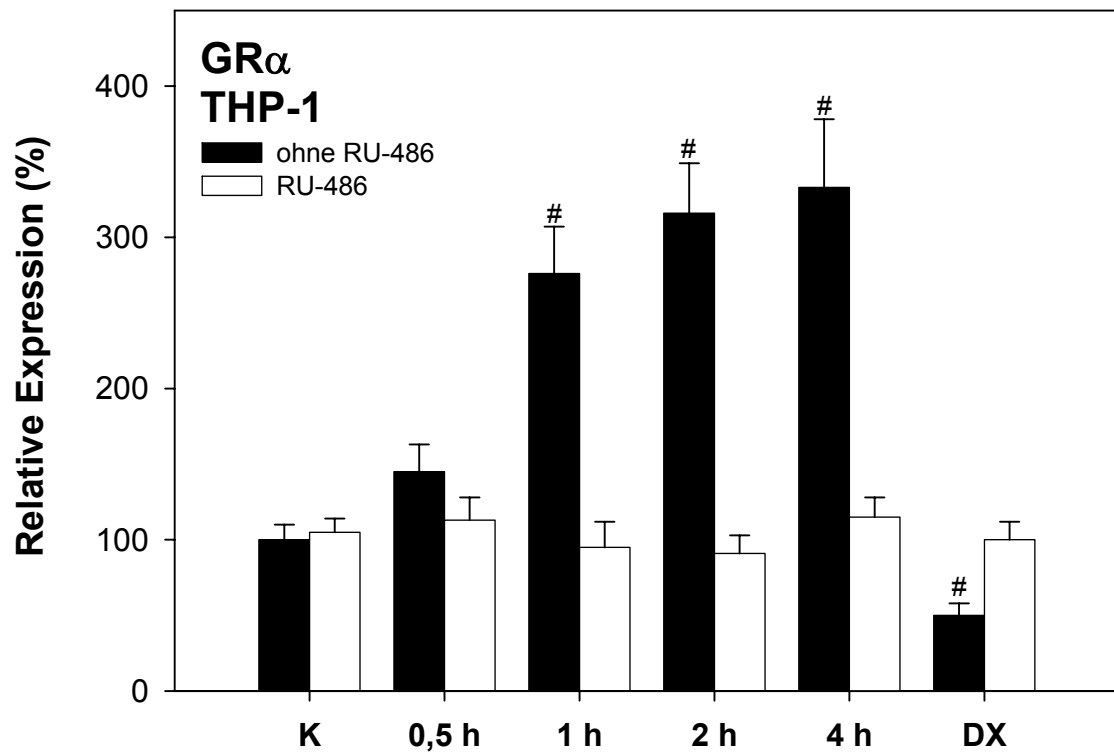


Abbildung 28: Expression der GR $\alpha$ -mRNA in THP-1-Zellen nach Stimulation mit Relaxin und RU-486 (n = 4, normiert auf GAPDH, 10 nmol/l Relaxin, 0,5  $\mu$ mol/l RU-486, DX: 100 nmol/l Dexamethason für 6 Stunden,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle).

Die mRNA-Expression von GR $\beta$  in THP-1-Zellen wurde weder von Dexamethason noch Relaxin mit oder ohne RU-486 signifikant beeinflusst (siehe Abbildung 29).



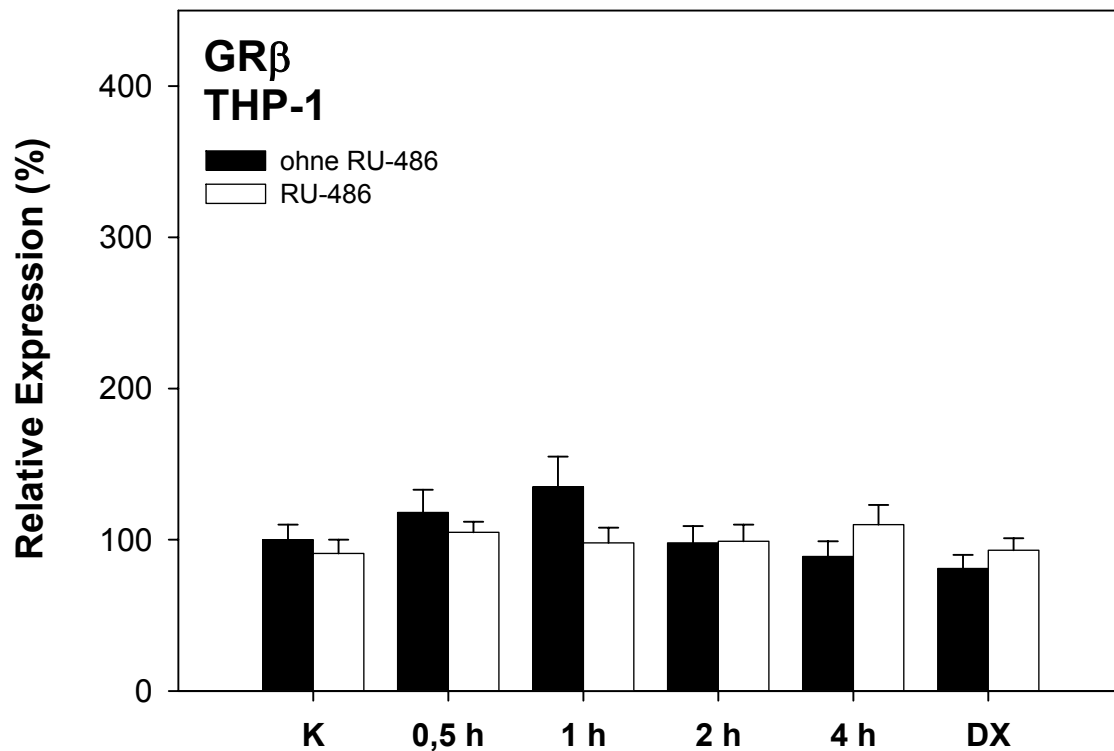


Abbildung 29: Expression der GR $\beta$ -mRNA in THP-1-Zellen nach Stimulation mit Relaxin und RU-486 (n = 4, normiert auf GAPDH, 10 nmol/ l Relaxin, 0,5  $\mu$ mol/ l RU-486, DX: 100 nmol/ l Dexamethason für 6 Stunden).

### 3.6 Regulation des Glukokortikoidrezeptors durch Relaxin auf Proteinebene

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Transkription des Glukokortikoidrezeptors auch eine erhöhte Proteinsynthese zur Folge hat, wurde das Verfahren des Western Blots gewählt.

Die detektierten Banden wurden densitometrisch ausgewertet und auf  $\alpha$ -Actin abgeglichen.

In HeLa-Zellen resultierte die 24-stündige Inkubation mit Dexamethason in einer Abnahme der GR-Proteinmenge um 40%. Relaxin hingegen führte zu einer Erhöhung der relativen Proteinmenge des Glukokortikoidrezeptors in HeLa-Zellen um

ca. 450% nach 4 Stunden und um 390% nach 24 Stunden (siehe Abbildung 30 und Abbildung 31). Auch auf Proteinebene wurden die Effekte von Dexamethason und Relaxin auf die GR-Expression durch RU-486 aufgehoben.

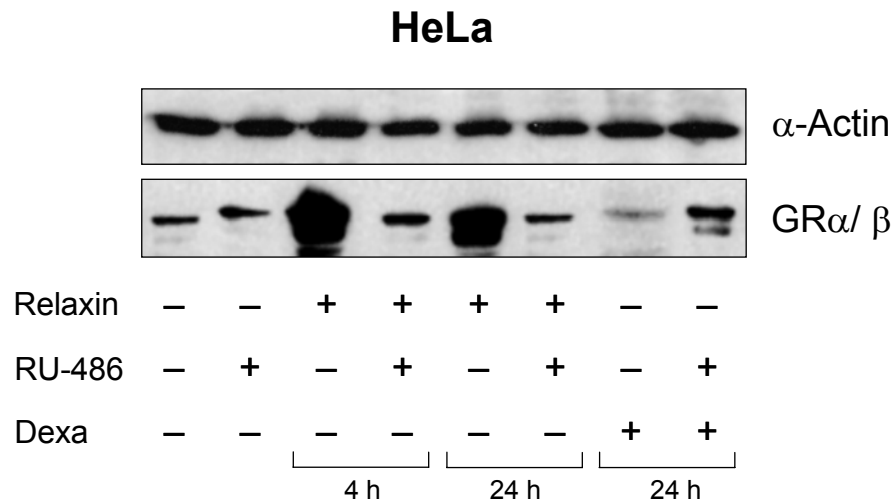


Abbildung 30: Western Blot nach 4- bzw. 24-stündiger Stimulation von HeLa-Zellen mit 10 nmol/ l Relaxin, 0,5  $\mu$ mol/ l RU-486 bzw. 100 nmol/ l Dexamethason (repräsentatives Beispiel aus n = 3 Versuchen).

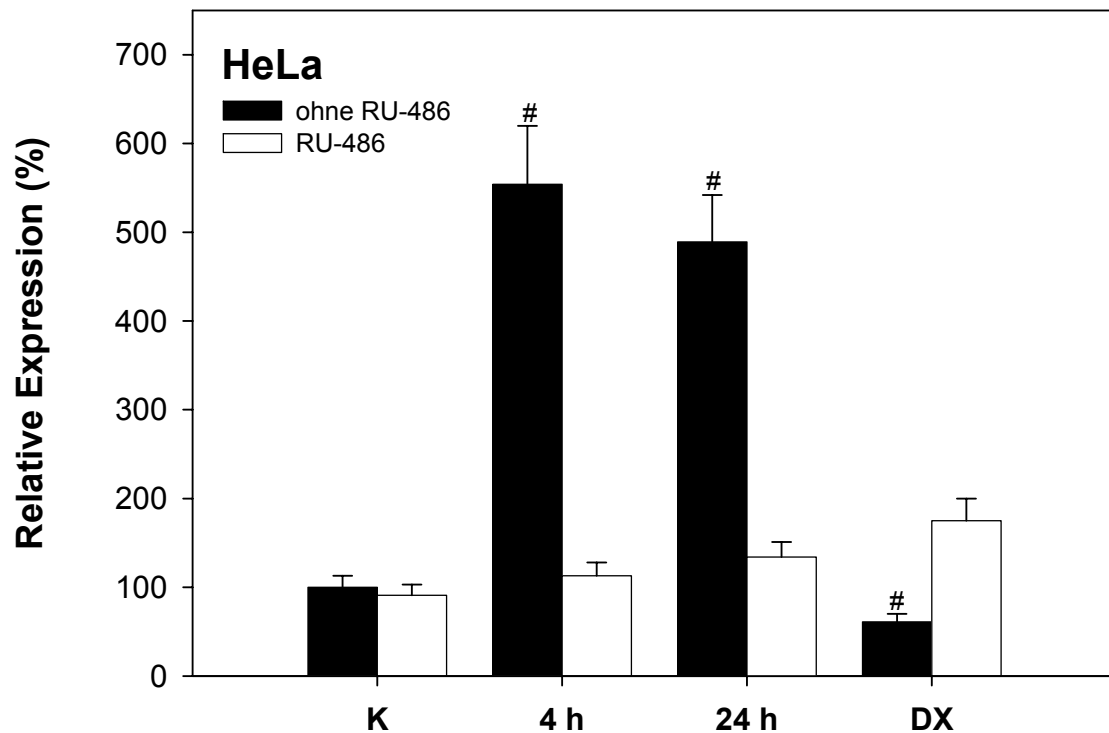


Abbildung 31: Veränderung der Glukokortikoidrezeptor-Proteinmenge in HeLa-Zellen nach 4- bzw. 24-stündiger Stimulation mit 10 nmol/l Relaxin und 0,5 µmol/l RU-486 bzw. 24-stündiger Inkubation mit 100 nmol/l Dexamethason (DX), normiert auf  $\alpha$ -Actin ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle).

In THP-1-Zellen zeigte sich folgendes Bild: Dexamethason führte zu einer signifikanten Abnahme des GR-Protein-Gehaltes um 45%. Relaxin hingegen hatte einen 155%igen bzw. 205%igen Anstieg nach 4 bzw. 24 Stunden zur Folge (siehe Abbildung 32 und Abbildung 33). Die Ko-Inkubation mit RU-486 unterdrückte auch hier die Effekte von Dexamethason bzw. Relaxin auf die Rezeptorexpression.

THP-1

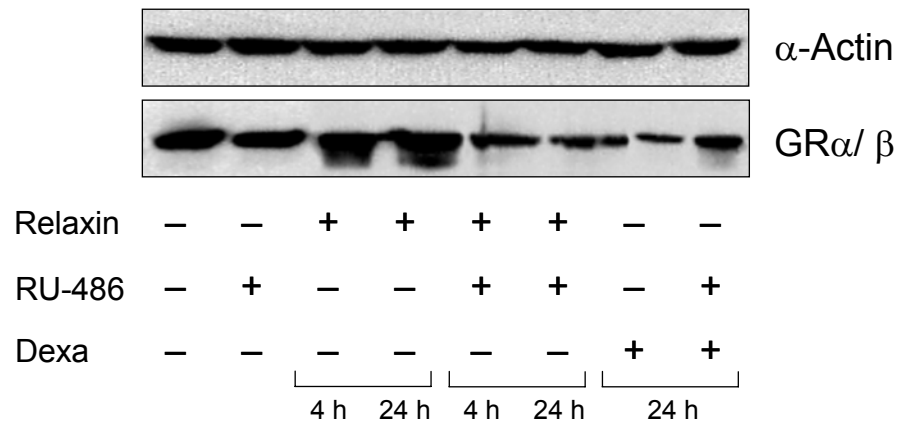


Abbildung 32: Western Blot nach 4- bzw. 24-stündiger Stimulation von THP-1-Zellen mit 10 nmol/l Relaxin, 0,5  $\mu$ mol/l RU-486 bzw. 100 nmol/l Dexamethason (Repräsentatives Beispiel aus n = 3 Versuchen).

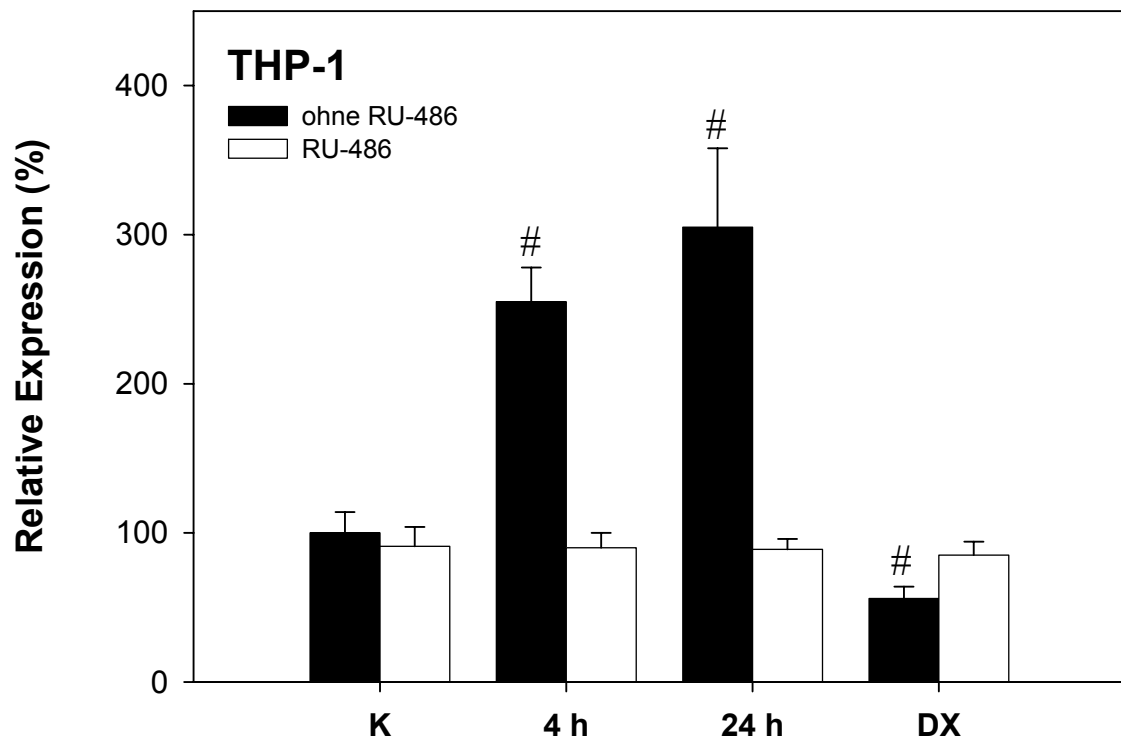


Abbildung 33: Veränderung der Glukokortikoidrezeptor-Proteinmenge in THP-1-Zellen nach 4- bzw. 24-stündiger Stimulation mit 10 nmol/ l Relaxin und 0,5  $\mu$ mol/ l RU-486 bzw. 24-stündiger Inkubation mit 100 nmol/ l Dexamethason (DX), normiert auf  $\alpha$ -Actin ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle).

### 3.6.1 Steroidfreies Medium

Sowohl für die mRNA- als auch die Protein-Messungen waren die Ergebnisse (je  $n = 3$ ) für „gestripptes“, steroidfreies Medium analog (Daten nicht gezeigt).

## 3.7 Sättigungskurven von $^3\text{H}$ -Dexamethason

Als funktioneller Nachweis für eine relaxininduzierte Erhöhung der Anzahl bindungsfähiger Glukokortikoidrezeptoren in der Zelle wurde die spezifische Bindungskapazität ( $B_S$ ) für mit Tritium markiertes Dexamethason bestimmt.

In HeLa-Zellen stieg die spezifische Bindung als Maß für die Glukokortikoidrezeptor-

tor-Konzentration durch 4- bzw. 24-stündige Vorinkubation mit 10 nmol/ l Relaxin von 51 auf 110 bzw. von 61 auf 135 pmol/ Ansatz an. Durch RU-486 wurde die spezifische Bindung auf 20 pmol/ Ansatz erniedrigt (siehe Abbildung 34).

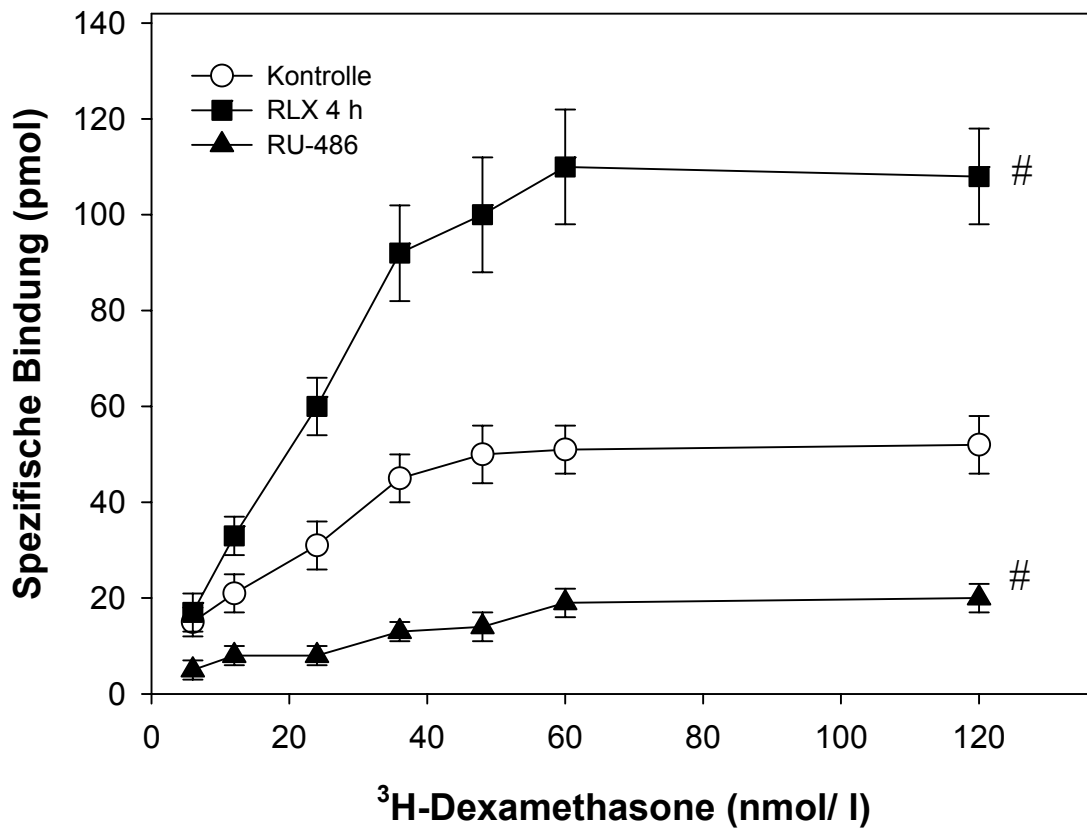


Abbildung 34: Sättigungskurve der spezifischen Bindung von  $^3\text{H-Dexamethason}$  in HeLa-Zellen und Veränderung durch Relaxin bzw. RU-486 ( $n = 3$ , Kontrolle: 2 Stunden mit entsprechender Menge an  $^3\text{H-Dexamethason}$  inkubiert, RLX 4 h: wie Kontrolle + vierstündige Vorbehandlung mit 10 nmol/ l Relaxin, RU-486: wie Kontrolle + 1  $\mu\text{mol/ l}$  RU-486 während der Inkubation,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle).

Bei den THP-1-Zellen kam es ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung der Rezeptoranzahl. Die  $B_{\text{max}}$  stieg nach vierstündiger Vorbehandlung mit Relaxin von 161 auf 301 pmol/ Ansatz und nach 24-stündiger Relaxin-Inkubation von 144 auf 311 pmol/ Ansatz. Durch RU-486 wurde die spezifische Bindung auf 25 pmol/ Ansatz erniedrigt (siehe Abbildung 35).

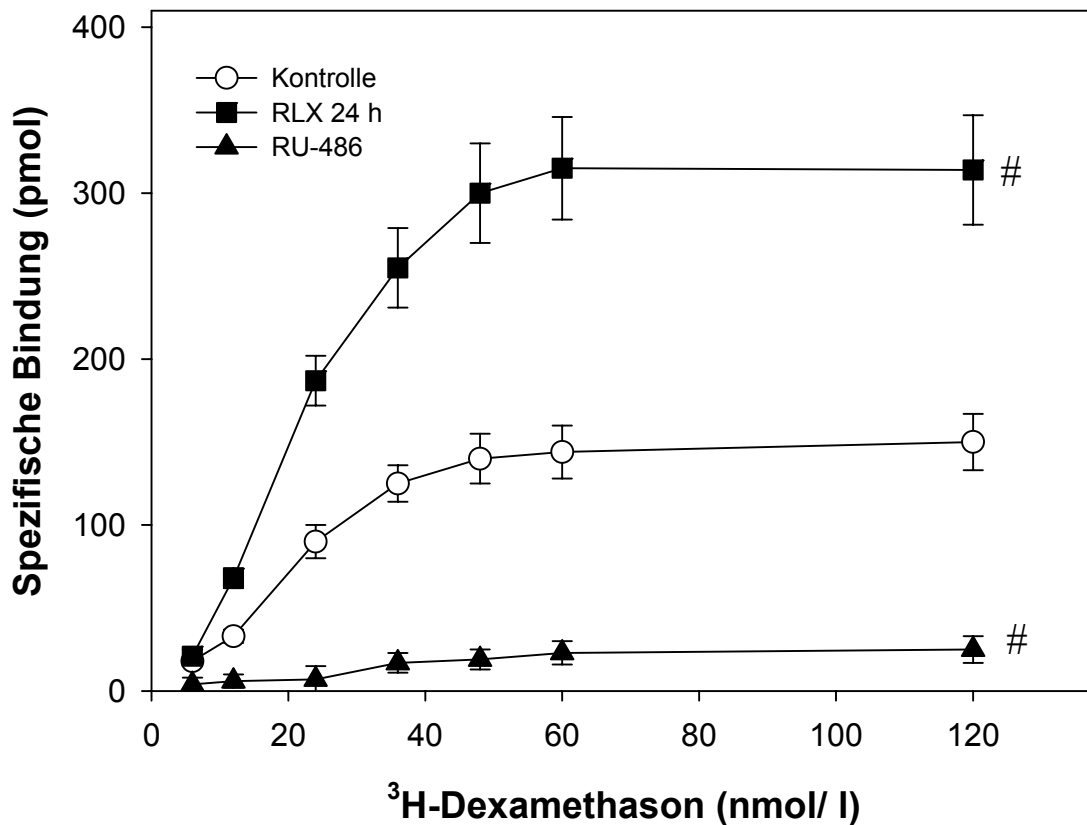


Abbildung 35: Sättigungskurve der spezifischen Bindung von  $^3\text{H-Dexamethason}$  in THP-1-Zellen und Veränderung durch Relaxin bzw. RU-486 ( $n = 3$ , Kontrolle: 1 Stunde mit entsprechender Menge an  $^3\text{H-Dexamethason}$  inkubiert, RLX 24 h: wie Kontrolle + 24-stündige Vorbehandlung mit 10 nmol/l Relaxin, RU-486: wie Kontrolle + 1  $\mu\text{mol/l}$  RU-486 während der Inkubation,  $p < 0,05$ , #: vs. Kontrolle).

Die Dissoziationskonstante  $K_d$  wurde durch die Stimulation mit Relaxin nicht beeinflusst (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6:  $K_d$  und  $B_{max}$  wurden durch Scatchard-Plots aus den Daten der Sättigungsbindungskurven berechnet. Beides sind lediglich apparente Größen, da die  $^3\text{H}$ -Dexamethason Konzentration in der Zelle nicht bestimmt werden kann (jeweils  $n = 3$ ).

		$K_d$ [nmol/ l]	$B_{max}$ [pmol/ Ansatz]	Zunahme $B_{max}$
HeLa-Zellen, 4 h Vorinkubation mit 10 nmol/ l Relaxin	Kontrolle	$20 \pm 7$	$51 \pm 6$	
	Relaxin	$19 \pm 5$	$110 \pm 13$	216%
HeLa-Zellen, 24 h Vorinkubation mit 10 nmol/ l Relaxin	Kontrolle	$19 \pm 8$	$61 \pm 8$	
	Relaxin	$21 \pm 4$	$135 \pm 15$	221%
THP-1-Zellen, 4 h Vorinkubation mit 10 nmol/ l Relaxin	Kontrolle	$27 \pm 5$	$161 \pm 18$	
	Relaxin	$26 \pm 7$	$301 \pm 32$	187%
THP-1-Zellen, 24 h Vorinkubation mit 10 nmol/ l Relaxin	Kontrolle	$23 \pm 6$	$144 \pm 16$	
	Relaxin	$24 \pm 5$	$311 \pm 33$	216%



## 4 Diskussion

Das erstmalig 1930 von H. L. Fevold beschriebene Peptidhormon Relaxin galt lange Zeit ausschließlich als zentrales Hormon der Schwangerschaft, verantwortlich für perinatale Effekte wie die Weitung des Geburtskanals. Seit den achtziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde das Spektrum der Relaxineffekte stetig um neue Aspekte wie Beeinflussung von Gefäßtonus, Nierenfunktion und Kollagenbilanz erweitert. Erst im Jahre 2002 wurden zwei membranständige Relaxin-Rezeptoren, LGR7 und LGR8, entdeckt.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass Relaxin

1. an den humanen Glukokortikoidrezeptor bindet und ihn aktiviert,
2. die Expression des Glukokortikoidrezeptors erhöht und
3. die  $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion humaner Makrophagen supprimiert.

Diese bisher unbekannte Interaktion mit dem Glukokortikoidrezeptor stellt dabei einen Ansatzpunkt zur Erklärung der pleiotropen Wirkung des Peptidhormons dar.

### 4.1 Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -Expression

Angeregt durch Befunde anderer Arbeitsgruppen, die eine antiasthmatische (Bani et al., 1997; Kenyon et al., 2003) und antiallergische (Masini et al., 1994; Piccinni et al., 2000) Wirkung des Relaxins zeigten, wurde in dieser Arbeit ein immumodulatorischer Effekt des Relaxins überprüft. Dabei zeigte eine Vorbehandlung mit Relaxin eine deutlich verringerte  $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion von Makrophagen nach Stimulation mit LPS (siehe u.a. Abbildung 12). Interessanterweise lies sich mit dem Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten RU-486 nicht nur die Wirkung des als Positivkontrolle eingesetzten Steroids Dexamethason aufheben, sondern auch die des Relaxins. Dieses Ergebnis lässt sich verschieden interpretieren:

1. Relaxin verstärkt die Wirkung der im Medium vorhandenen endogenen Steroide am Glukokortikoidrezeptor.
2. Relaxin selbst aktiviert den Glukokortikoidrezeptor.

Um diese Frage zu klären, wurden die Versuche mit steroidfreiem, sog. „gestripptem“, Medium wiederholt. Die immunmodulatorischen Effekte des Relaxins blieben in voller Stärke bestehen. Da Makrophagen keine endogene Kortisolsynthese aufweisen und das verwendete Medium von Steroiden befreit wurde, lässt sich schließen, dass Relaxin auch ohne die Anwesenheit von Kortisol dazu in der Lage ist, den Rezeptor zu aktivieren.

### **4.2 Bindung an den Glukokortikoidrezeptor-Proteinkomplex**

Da die obigen Daten eine Aktivierung des GR durch Relaxin nahe legten, wurde mittels Koimmunpräzipitationen untersucht, ob Relaxin an den Glukokortikoidrezeptor bindet. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß regelmäßig eine Assoziation des Glukokortikoidrezeptors mit HSP70 und HSP90. Diese Proteine sind bekannte Bestandteile des Protein-Rezeptor-Komplexes des GR. Der hauptsächlich im Zytoplasma der Zelle befindliche, nicht aktivierte Rezeptor benötigt die Bindung von verschiedenen Proteinen, um durch ein Glukokortikoid aktivierbar zu sein (Dao-Phan et al., 1997; Wikstrom et al., 1986; Rajapandi et al., 2000).

Im Glukokortikoidrezeptor-Präzipitat fand sich jedoch neben diesen bekannten, die Struktur und Faltung beeinflussenden Hilfsproteinen („chaperons“) auch regelmäßig Relaxin (Abbildung 18). Dies zeigt, dass Relaxin an den Glukokortikoidrezeptorkomplex binden kann. Ob Relaxin direkt an den Rezeptor bindet oder sich an eines der zum heterooligomeren Rezeptor-Proteinkomplex gehörenden Proteine anlagert, kann anhand dieser Daten nicht beurteilt werden. Ebenfalls kann nicht unterschieden werden, ob Relaxin einen Liganden für den Rezeptor oder ein sog. „chaperon“ darstellt. Zusammen mit der auch in steroidfreiem Medium beobachteten TNF $\alpha$  supprimierenden Wirkung scheint die Funktion als agonistischer Ligand jedoch deutlich wahrscheinlicher.

Um am im Zytoplasma lokalisierten Glukokortikoidrezeptor wirken zu können, muss exogen zugeführtes Relaxin zunächst in die Zelle gelangen. Mit einem Molekulargewicht von 6,3 kDa und leicht hydrophilem Charakter ist eine freie Diffusion in die Zelle eher unwahrscheinlich. Eine Aufnahme via Endozytose bzw. über einen aktiven Transportmechanismus ist in der Literatur bisher nicht beschrieben, scheint jedoch wahrscheinlicher.

Ein interessanter Nebenbefund waren die relativ hohen endogenen Relaxinspiegel der HeLa-Zellen, die sich auch in den Kern-/ Zytoplasmaextrakten (siehe Abbildung 20) zeigten. Dies ist für Zellen des Reproduktionstraktes nicht völlig unerwartet, aber meines Wissens noch nicht beschrieben worden.

### **4.3 Translokation des Glukokortikoidrezeptors in den Nukleus nach Stimulation mit Relaxin**

Da ein aktivierter Glukokortikoidrezeptor zur Vermittlung seiner Effekte in den Kern transloziert werden muss, schlossen sich Untersuchungen zur Verteilung des GR zwischen Kern und Zytoplasma an.

Die Stimulation mit Dexamethason, als potentem Agonisten, führte erwartungsgemäß zu einer starken Zunahme der nukleären Glukokortikoidrezeptorkonzentration nach 30 Minuten (Abbildung 19).

Nach Inkubation mit Relaxin zeigte sich nach 30 Minuten ebenfalls eine deutlich verstärkte Translokation des Glukokortikoidrezeptors in den Kern. Zeitgleich findet sich dort auch eine erhöhte Relaxin-Konzentration (Abbildung 20). Dies ist ein weiteres Indiz für eine Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors durch Bindung von Relaxin mit daraus resultierendem verstärktem Transport von Relaxin und Rezeptor in den Zellkern.

### **4.4 Bindung an die „glucocorticoid response elements“**

Zur Überprüfung der These, dass die Interaktion von Relaxin mit dem Glukokortikoidrezeptor auch zu dessen Aktivierung führt, wurde die Wirkung auf so genannte „glucocorticoid response elements“ (GRE) gemessen. Der aktivierte Glukokortikoidrezeptor vermittelt einen Großteil seiner Effekte über die Bindung an GRE in zahlreichen Promotoren mit konsekutiver Expressionssteigerung der anhängenden Gene.

Experimente nach transienter Transfektion von HeLa- und THP-1-Zellen mit einem GRE-Luziferase-Reportergen-Konstrukt zeigten eine deutliche Zunahme der Luziferase-Aktivität um Faktor 5 bis 7 nach Inkubation mit Relaxin (siehe Abbildung 23

und Abbildung 24). Diese ließ sich durch Behandlung mit RU-486 vollständig aufheben.

Diese durch einen GR-Antagonisten neutralisierbaren Befunde sind ein weiteres Indiz dafür, dass Relaxin den Glukokortikoidrezeptor aktivieren kann.

Ob ein durch Relaxin aktivierter Glukokortikoidrezeptor auch indirekte genomische Effekte – das sog. „cross-talk mit anderen Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1) – ausübt, kann aus mit diesem Versuchsansatz nicht beurteilt werden.

## 4.5 Steigerung der GR-mRNA- und GR-Proteinmenge

### 4.5.1 Einleitung

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden zwei Glukokortikoidrezeptor-Typen unterschieden: GR $\alpha$  und GR $\beta$ . GR $\beta$  soll keine typischen Glukokortikoid-Wirkungen vermitteln, sondern im Gegenteil durch Zusammenlagerung mit aktiviertem GR $\alpha$  zu einem Heterodimer dessen Wirkung aufheben (Oakley et al., 1999). Bei den folgenden Ergebnissen ist eine Unterscheidung zwischen GR $\alpha$  und GR $\beta$  nur auf mRNA-Ebene möglich, da im Western Blot mit einem nicht  $\alpha/ \beta$ -selektiven Antikörper gearbeitet wurde. Jedoch liegen die GR $\alpha$ -Spiegel in den Zellen physiologischerweise um ein Vielfaches über denen des GR $\beta$  (Oakley et al., 1996), sodass die gemessenen GR-Proteinmengen weitgehend GR $\alpha$  darstellen sollten.

### 4.5.2 Dexamethason

Die Inkubation mit Dexamethason führte wie erwartet (Cidlowski und Cidlowski, 1981) zu einer recht deutlichen Abnahme der mRNA-Expression des „aktiven“ Glukokortikoidrezeptors  $\alpha$  in HeLa- und THP-1-Zellen um 33 bzw. 40% (siehe Abbildung 26 und Abbildung 28).

Auch auf Proteinebene kam es nach Zugabe des hochpotenten Kortikoids in THP-1-Zellen zu einer ausgeprägten Abnahme des GR um 40 bzw. 45% (siehe Abbildung 31 und Abbildung 33). Diese Befunde passen gut zu einer mehrgleisigen negativen Autoregulation des GR nach Aktivierung durch ein Glukokortikoid, die sowohl durch Verminderung der GR-mRNA-Expression, als auch durch einen

beschleunigen Abbau des Proteins vermittelt wird (siehe Einleitung).

Alle Effekte des Dexamethasons konnten durch Koinkubation mit dem GR-Antagonisten RU-486 auf ein nicht signifikantes Niveau gesenkt werden.

### 4.5.3 Relaxin

Interessanterweise zeigte sich ein inverser Effekt des Relaxins zum Dexamethason. Während das Steroid die Glukokortikoidrezeptor-Expression hemmte, erhöhte Relaxin die GR-Anzahl. Die 24-stündige Inkubation von HeLa- und THP-1-Zellen mit Relaxin führte zu einer Zunahme der GR-Proteinmenge um den Faktor 4 bzw. 2 (siehe Abbildung 31 und Abbildung 33).

Auch auf mRNA-Ebene war zeigte sich ein Zunahme der GR-Expression. Nach zwei Stunden Relaxin-Inkubation waren die GR $\alpha$ -mRNA-Spiegel in HeLa-Zellen und in THP-1-Zellen um ca. den Faktor 2 erhöht (siehe Abbildung 26 und Abbildung 28).

Der GR $\beta$ -mRNA-Spiegel in den THP-1-Zellen wurde durch Relaxin nicht signifikant geändert (siehe Abbildung 29). In HeLa-Zellen kam es zwar zu einem signifikanten Anstieg der GR $\beta$ -mRNA (siehe Abbildung 27), dieser war jedoch mit 85% nach zwei Stunden im Vergleich zum GR $\alpha$  relativ schwach ausgeprägt.

Auch die Auswirkungen des Relaxin auf die GR-Expression wurden durch Koinkubation mit RU-486 auf ein nicht signifikantes Niveau gesenkt.

### 4.5.4 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass Relaxin in HeLa- und THP-1-Zellen die Glukokortikoidrezeptor-Expression hochreguliert und dies offensichtlich auch durch Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors vermittelt wird, da RU-486 die Effekte unterdrückt.

Da die zelluläre Wirkung von Glukokortikoiden im Regelfall durch die Zahl an Rezeptoren begrenzt wird (Sapolsky et al., 2000), führt diese erhöhte Expression zu einer größeren Suszeptibilität der Zelle für glukokortikoide Stimuli.

Diese Befunde sind insofern interessant, da hier erstmals die Wirkung des Relaxins von der Wirkung des Steroids Dexamethason abweicht.

### **4.6 Steigerung der funktionellen Rezeptorzahl in der Zelle**

Um nachzuweisen, dass die gefundenen Expressionssteigerungen des Glukokortikoidrezeptors auf mRNA- und Proteinebene auch einen funktionellen Effekt zur Folge haben, wurde die Anzahl bindungsfähiger Rezeptoren in THP-1- und HeLa-Zellen ermittelt. Dazu wurden Sättigungskurven mit radioaktiv markiertem Dexamethason durchgeführt. Die Höhe der maximalen spezifischen Bindung in der Zelle wurde vor und nach 4- bzw. 24-stündiger Inkubation mit Relaxin bestimmt.

Die Zahl der bindungsfähigen Rezeptoren in HeLa- bzw. THP-1-Zellen verdoppelte nach 4-stündiger Relaxinstimulation. Eine 24-stündige Stimulation erbrachte eine geringe weitere Steigerung. Diese Daten zeigen, dass die durch Relaxin ausgelösten mRNA- und Protein-Expressionsteigerungen des GR auch tatsächlich zu einer funktionell relevanten Zunahme der bindungsfähigen Glukokortikoidrezeptoren in der Zelle führen.

Die Dissoziationskonstante des GR für Dexamethason änderte sich durch die Behandlung mit Relaxin hingegen nicht. Dies zeigt, dass Relaxin nicht die Bindungseigenschaften des Rezeptors für Glukokortikoide ändert.

### **4.7 Konsequenzen und Ausblicke**

Diese Befunde zeigen einen interessanten, bisher unbekanntem Wirkmechanismus des Relaxins. Das Hormon übt nicht nur eine Wirkung auf die kürzlich entdeckten membranständigen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren LGR7 und LGR8 aus sondern auch auf den zytoplasmatischen Glukokortikoidrezeptor.

Die Ergebnisse zeigen, dass Relaxin an den Glukokortikoidrezeptor-Proteinkomplex bindet und zu seiner Aktivierung und Translokation in den Kern führt. Dort wirkt er als Transkriptionsfaktor und erhöht z.B. die Transkription von Genen mit GRE-Sequenzen im Promotor.

Die Effekte, die ein mit Relaxin aktivierter Glukokortikoidrezeptor vermittelt, unter-

scheiden sich jedoch teilweise von denen, die ein mit Dexamethason (stellvertretend für die Gruppe der Glukokortikoide) aktivierter Glukokortikoidrezeptor auslöst. Relaxin als Ligand führte beispielsweise in den Versuchen zu einer Erhöhung der Glukokortikoidrezeptor-Konzentration, Dexamethason hingegen senkte die Menge an Glukokortikoidrezeptoren.

Ein mögliches Erklärungsmodell für diese Liganden-abhängige Wirkung liefert ein anderer Steroidrezeptor, der Östrogen-Rezeptor. Bei diesem wurde kürzlich entdeckt, dass verschiedene Liganden durch Bindung am gleichen Rezeptor unterschiedliche Effekte auslösen (Park und Jordan, 2002). Diese so genannten SERM (selective estrogen receptor modulators), führen vermutlich zu spezifischen Konformationsänderungen (Kraichely et al., 2000), die dann im Zusammenspiel mit anderen Kofaktoren unterschiedliche Effekte bezüglich Gen-Aktivierung oder -Suppression bewirken (Jordan, 2001). Auch für den GR wurden bereits nichtsteroidale selektive Rezeptor-Modulatoren beschrieben (Link et al., 2004; Schulz und Eggert, 2004).

Analog dazu könnte die Bindung des Relaxins eine Konformationsänderung des Glukokortikoidrezeptors mit konsekutiver Modulation seiner Wirkung auslösen. Dadurch wäre eine Änderung der Affinität des Glukokortikoidrezeptors für einzelne (n)GRE ebenso wie die Bindung an neue Promotoren denkbar (Schoneveld et al., 2004). Ferner ist eine Wirkungsänderung an den klassischen Bindungsstellen bis hin zu einer Umkehr der Beeinflussung der Transkription denkbar (Resche-Rigon und Gronemeyer, 1998). Ähnlich wie bei den SERM könnten auch beim Glukokortikoidrezeptor in Abhängigkeit vom Liganden unterschiedliche Koaktivatoren bzw. Korepressoren gebunden werden, die die Wirkung des Rezeptors modulieren (Jenkins et al., 2001). Dies stellt eine mögliche Erklärung für die verstärkte Expression des Glukokortikoidrezeptors nach Behandlung mit Relaxin im Gegensatz zur Inkubation mit Glukokortikoiden dar.

Unterschiedliche Wirkungen von Relaxin und Glukokortikoiden werden sicher auch daher resultieren, dass die Wirkung von Relaxin ein Summationseffekt der Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren LGR7/ LGR8 und des zytoplasmatischen Glukokortikoidrezeptors ist. Zwar ist die beobachtete Erhöhung der Glukokortikoidrezeptor-Menge durch RU-486 aufhebbar, so dass sie sehr wahrscheinlich der Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors durch Relaxin bedarf, jedoch ist

eventuell die parallele Aktivierung der LGR7/ LGR8 ebenfalls eine notwendige Bedingung.

Ferner wird die Wirkung des Relaxins auf verschiedene Zellen von deren spezifischem Verhältnis von LGR7/ LGR8-Rezeptoren und Glukokortikoidrezeptoren zueinander abhängen.

### 4.7.1 Klinische Bezüge

Natürlich ist es problematisch, aufgrund von In-vitro-Untersuchungen an zwei Zelllinien auf Effekte am lebenden Organismus zu schließen, jedoch möchte ich zumindest einige Gedanken erwähnen.

#### 4.7.1.1 Neue Therapieansätze

Ein interessantes Anwendungsgebiet eröffnet der hier gezeigte Effekt der Steigerung der Glukokortikoidrezeptorexpression: chronische Behandlung mit Steroiden führt durch Herunterregulation der Glukokortikoidrezeptordichte häufig zur so genannten Steroidresistenz (Silva et al., 1994). Hier könnte Relaxin durch seinen die Glukokortikoidrezeptoranzahl erhöhenden Effekt möglicherweise eine therapeutische Option bieten. Das eine systemische Anwendung prinzipiell möglich ist, zeigte eine Sklerodermie-Studie mit über 60 Patienten, in der Relaxin bei subcutaner Infusion nur eine sehr geringe Nebenwirkungsrate (v. a. Regelblutungsverstärkung und leichte Anämie) zeigte (Seibold et al., 2000).

Darüber hinaus ist eine Steigerung der Suszeptibilität für Glukokortikoide durch lokale Erhöhung der Glukokortikoidrezeptordichte mittels topischer Relaxinapplikation vorstellbar. Dies könnte einen Einsatz bei akuten wie chronischen Hauterkrankungen, bei denen Glukokortikoide eine große Rolle spielen, sinnvoll machen.

Neben diesem die Steroidsensitivität-erhöhenden Effekt, zeigte sich auch ein eigener inflammationshemmender Effekt, der die  $TNF\alpha$ -Expression ohne Anwesenheit von Glukokortikoide senkte. Wenn sich dies in vivo bestätigt, könnte Relaxin ein relativ nebenwirkungsarmes Therapeutikum für viele Krankheitsbilder, in denen  $TNF\alpha$  ein zentraler Mediator ist, darstellen. Dazu gehören vor allem Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis (O'Dell, 2004), aber auch bei der



chronischen Herzinsuffizienz wird das kardiodepressive  $\text{TNF}\alpha$  als wichtiger Mediator gesehen (Wolfe und Michaud, 2004; Sekiguchi et al., 2004).

Vor kurzem als „Player“ bei der chronischen Herzinsuffizienz bekannt geworden (Dschietzig et al., 2001), ist das gefäßdilatierende und eventuell antiinflammatorische Profil auch für die koronare Herzkrankheit interessant. Bei der Atherogenese spielt die chronische Entzündung eine wichtige Rolle (Shishehbor und Bhatt, 2004), wie auch Untersuchungen an atherosklerotisch veränderten Gefäßen zeigten. Befunde zeigten eine stark verminderte Glukokortikoidrezeptoranzahl in atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden, die eine fehlende Proliferationshemmung durch Glukokortikoide zur Folge hat (Bray et al., 1999).

### *4.7.1.2 Neue Bewertung von bekannten Befunden*

Die während der Schwangerschaft auftretenden hohen Relaxinspiegel sind – neben den physiologisch erhöhten endogenen Kortisonspiegeln – auch eine mögliche Erklärung für die bekannte Erhöhung der Immuntoleranz, beispielsweise mit Abschwächung autoimmuner Krankheiten wie des Lupus erythematodes bei Schwangeren.

Die positive Wirkung des Relaxins bei Überexpressionen von Bindegewebe, z. B. bei Sklerodermie (Seibold et al., 2000) und Lungenfibrose (Unemori et al., 1993), wurde bisher immer allein der Expressionssteigerung der MMP und der Inhibition ihrer Hemmer (TIMP) zugeschrieben. Die Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors könnte auch einen Betrag dazu leisten; bekanntermaßen wirken Glukokortikoide stark antiproliferativ (Almawi und Melemedjian, 2002).

## **4.8 Abschließende Bemerkung**

Im Rahmen dieser Dissertation konnte erstmals gezeigt werden, dass Relaxin neben seiner bekannten Wirkung auf die membranständigen Rezeptoren LGR7 und LGR8 mit dem Glukokortikoidrezeptor interagiert. Die Identifizierung dieses neuen Wirkmechanismus des Relaxins kann als Ausgangspunkt weiterer Studien einen Beitrag zur Aufklärung der unterschiedlichen hormonellen Effekte des Peptidhormons leisten.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit an HeLa- und THP-1-Zellen konnte erstmals gezeigt werden, dass das Peptidhormon Relaxin an den Multiproteinkomplex des Glukokortikoidrezeptors bindet, den Rezeptor aktiviert und seine Expression steigert.

Relaxin verringerte die Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  aus Makrophagen nach Stimulation mit bakteriellem Endotoxin. Dieser Effekt konnte durch den GR-Antagonisten RU-486 aufgehoben werden.

In HeLa-Zellen wurde mittels Koimmunpräzipitationen und Western Blots gezeigt, dass Relaxin an den Glukokortikoidrezeptor-Komplex bindet und es innerhalb von 30 Minuten nach Inkubation mit Relaxin zu einer verstärkten Translokation des Rezeptors in den Kern kommt.

Durch transiente Transfektion von HeLa- und THP-1-Zellen mit einem „glucocorticoid response elements“-Luziferase-Reportergenkonstrukts konnte eine deutliche Steigerung der GRE-abhängigen Luziferase nach Relaxinstimulation festgestellt werden. Diese Aktivierung konnte durch RU-486 vollständig unterdrückt werden.

Eine relaxininduzierte Expressionssteigerung des Glukokortikoidrezeptors in HeLa- und THP-1-Zellen wurde auf mRNA- und Proteinebene gezeigt. Die Zunahme der Expression wurde durch RU-486 aufgehoben. Dass diese Effekte auch funktionell wirksam sind, wurde durch Erhöhung der spezifischen Bindungskapazität für  $^3\text{H}$ -Dexamethason in beiden Zellarten gezeigt.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AB	Antikörper
AC	Adenylatzyklase
ADH	antidiuretisches Hormon
AMV	Avian-Myeloblastosis-Virus
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP-1	activating protein 1
ATCH	adrenocorticotropes Hormon; Corticotropin
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CRF	Corticotropin-freisetzender Faktor
DBD	DNA binding domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence Lösung
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzymaminoassay
ET-1	Endothelin-1
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ ms}^{-2}$ )
GAPDH	Glycerolaldehydphosphatdehydrogenase
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	Glucocorticoid response element
hsp70	Hitzeschockprotein 70
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IL-6	Interleukin 6
LBD	ligand binding domain
LGR	leucinreiche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

LPS	Lipopolysaccharid
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mRNA	messenger RNA
NF $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
nGRE	negative glucocorticoid response elements
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMA	Phorbol Myristate Acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SERM	selective estrogen receptor modulators
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose-Faktor alpha
tPA	tissue plasminogen activator
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 7 Literaturverzeichnis

1. Almawi W. Y., Melemedjian O. K.: Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J. Leukoc. Biol.* 2002, 71, S. 9-15.
2. Bani D., Ballati L., Masini E., Bigazzi M. and Sacchi T. B.: Relaxin counteracts asthma-like reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pigs. *Endocrinology.* 1997, 138, S. 1909–1915.
3. Bani D., Masini E., Bello M. G., Bigazzi M. and Sacchi T. B.: Relaxin activates the L-arginine-nitric oxide pathway in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1995a, 55, S. 5272–5275.
4. Bani D., Bigazzi M., Masini E., Bani G. and Sacchi T. B.: Relaxin depresses platelet aggregation: in vitro studies on isolated human and rabbit platelets. *Lab. Invest.* 1995b, 73, S. 709–716.
5. Bani D., Maurizi M. and Bigazzi M.: Relaxin reduces the number of circulating platelets and depresses platelet release from megakaryocytes: studies in rats. *Platelets.* 1995c, 6, S. 330–335.
6. Bani D., Failli P., Bello M. G., Thiernemann C., Bani Sacchi T., Bigazzi M. et al.: Relaxin activates the L-argininenitric oxide pathway in vascular smooth muscle cells in culture. *Hypertension.* 1998a, 31, S. 1240–1247.
7. Bani D., Masini E., Bello M. G., Bigazzi M. and Sacchi T. B.: Relaxin protects against myocardial injury caused by ischemia and reperfusion in rat heart. *Am. J. Pathol.* 1998b, 152, S. 1367–1376.
8. Bani D., Nistri S., Quattrone S., Bigazzi M. and Bani Sacchi T.: The vasorelaxant hormone relaxin induces changes in liver sinusoid microcirculation: a morphologic study in the rat. *J. Endocrinol.* 2001, 171, S. 541–549.
9. Bani D.: Relaxin: a pleiotropic hormone. *Gen. Pharmacol.* 1997a, 28, S. 13-22.
10. Bani D.: Relaxin and breast cancer. *Bull. Cancer.* 1997b, 84, S. 179–182.
11. Bani G., Bigazzi M. and Bani D.: Effects of relaxin on the mouse mammary gland. I. The myoepithelial cells. *J. Endocrinol. Invest.* 1985, 8, S. 207–215.

12. Bani G., Bigazzi M. and Bani D.: The effects of relaxin on the mouse mammary gland. II. The epithelium. *J. Endocrinol. Invest.* 1986, 9, S. 145–152.
13. Bani-Sacchi T., Bigazzi M., Bani D., Mannaioni P. F. and Masini E.: Relaxin-induced increased coronary flow through stimulation of nitric oxide production. *Br. J. Pharmacol.* 1995, 116, S. 1589-94.
14. Bartsch O., Bartlick B., Ivell R.: Relaxin signalling links tyrosine phosphorylation to phosphodiesterase and adenylyl cyclase activity. *Mol. Hum. Reprod.* 2001a, 7, S. 799–809
15. Bartsch O., *et al.*: Relaxin signal transduction couples tyrosine phosphorylation to cAMP upregulation. In *Relaxin 2000* (Tregear, G.W. *et al.*, eds) Kluwer Academic Publishers. 2001b, S. 309–316.
16. Bathgate R. A. D., Samuel C. S., Burazin T. C. D., Layfield S., Claasz A. A., Reytomas I. G. T. *et al.*: Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene: novel members of the relaxin peptide family. *J. Biol. Chem.* 2001, 277, S. 1148-1157.
17. BD Biosciences Clontech: pGRE-Luc Vector Information. 2002
18. Bellingham D. L., Sar M., Cidlowski J. A.: Ligand-dependent down-regulation of stably transfected human glucocorticoid receptors is associated with loss of functional glucocorticoid responsiveness. *Mol. Endocrinol.* 1992, 6, S. 2090–2102.
19. Bianchi S., Bani G. and Bigazzi M.: Effects of relaxin on the mouse mammary gland. III. The fat pad. *J. Endocrinol. Invest.* 1986, 9, S. 153–160.
20. Bigazzi M., Brandi M. L., Bani G. and Sacchi T. B.: Relaxin influences the growth of MCF-7 breast cancer cells. Mitogenic and antimitogenic action depends on peptide concentration. *Cancer.* 1992, 70, S. 639–643.
21. Bigazzi M., Del Mese A., Petrucci F., Casali R. and Novelli G. P.: The local administration of relaxin induces changes in the microcirculation of the rat mesocaecum. *Acta Endocrinol.* 1986, 112, S. 296–299.
22. Bigazzi M., Nardi E., Bruni P. and Petrucci F.: Relaxin in human decidua. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1980, 51, S. 939-941.

23. Blundell T. L. and Humbel R. E.: Hormone families: pancreatic hormones and homologues growth factors. *Nature*. 1980, 287, S. 781-787.
24. Bodwell J. E., Hu J. M., Orti E., Munck A.: Hormone-induced hyperphosphorylation of specific phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995, 52, S. 135–40.
25. Bortz J, Lienert G. A., Boehnke K.: Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. Springer Verlag. 1990
26. Bray P. J., Du B., Mejia V. M., Hao S. C., Deutsch E., Fu C., Wilson R. C., Hanauske-Abel H., McCaffrey T. A.: Glucocorticoid resistance caused by reduced expression of the glucocorticoid receptor in cells from human vascular lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999, 19, S. 1180-9.
27. Bronnegard M.: Steroid receptor number. Individual variation and downregulation by treatment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1996, 154, S. S28–S33.
28. Bryant-Greenwood G. D. and Schwabe C.: Human relaxins: chemistry and biology. *Endocrine Rev*. 1994, 15, S. 5-26.
29. Bullesbach EE, Schwabe C.: Functional importance of the A chain loop in relaxin and insulin. *J Biol Chem*. 1994, 269, S. 13124-8.
30. Burnstein K. L., Bellingham D. L., Jewell C. M., Powell-Oliver F. E., and Cidlowski J. A.: Autoregulation of glucocorticoid receptor gene expression. *Steroids*. 1991, 56, S. 52–58.
31. Cadepond F., Ulmann A., Baulieu E. E.: RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annu Rev Med*. 1997, 48, S. 129-56.
32. Cidlowski J. A., Cidlowski N. B.: Regulation of glucocorticoid receptors by glucocorticoids in cultured HeLa S3 cells. *Endocrinology*. 1981, 109, S. 1975-82.
33. Danielson L. A., Sherwood O. D. and Conrad K. P.: Relaxin is a potent renal vasodilator in conscious rats. *J. Clin. Invest*. 1999, 103, S. 525–533.
34. Dao-Phan H. P., Formstecher P., Lefebvre P.: Disruption of the glucocorticoid receptor assembly with heat shock protein 90 by a peptidic antiglucocorticoid. *Mol. Endocrinol*. 1997, 11, S. 962–972.

35. Dayanithi G., Cazalis M. and Nordmann J. J.: Relaxin affects the release of oxytocin and vasopressin from the neurohypophysis. *Nature*. 1987, 325, S. 813–816.
36. Dschietzig T., Bartsch C., Richter C., Laule M., Baumann G., Stangl K.: Relaxin, a pregnancy hormone, is a functional endothelin-1 antagonist: attenuation of endothelin-1-mediated vasoconstriction by stimulation of endothelin type-B receptor expression via ERK-1/2 and nuclear factor-kappaB. *Circ Res*. 2003, 92, S. 32-40.
37. Dschietzig T., Richter C., Bartsch C., Laule M., Armbruster F. P., Baumann G. et al.: The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure. *FASEB J*. 2001, 15, S. 2187–2195.
38. Dschietzig T., Stangl K.: Relaxin: a pregnancy hormone as central player of body fluid and circulation homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci*. 2002, 59, S. 1–13.
39. Erikson M. S. and Unemori E. N.: Relaxin trials in systemic sclerosis. In: *Proceedings of the 3rd Int. Conf. on RLX and Related Peptides (Broome, Aus.)*. 2000, S. 373–381.
40. Essig M., Schoenfeld C., D'Eletto R., Amelar R., Oubin L. and Steinetz B. G.: Relaxin in human seminal plasma. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1982, 380, S. 224–230.
41. Failli P., Nistri S., Quattrone S., Mazzetti L., Bigazzi M., Bani Sacchi T. et al.: Relaxin upregulates inducible nitric oxide expression and nitric oxide generation in rat coronary endothelial cells. *FASEB J*. 2001, 16, S. 252–254.
42. Fevold H. L., Hisaw F. L. and Meyer R. K.: The relaxative hormone of the corpus luteum. 1st purification and concentration. *J. Am. Chem. Soc*. 1930, 52, S. 3340-3348
43. Fields P. A., Lee A. B., Haab L. M., Hwang J. and Sherwood D.: Evidence for a dual source of relaxin in the pregnant rat: immunolocalization in the corpora lutea and endometrium. *Endocrinology*. 1992, 130, S. 2985–2990.
44. Garber S. L., Mirochnik Y., Brecklin C. S., Unemori E. N., Singh A. K., Slo-



- bodskoy L. et al.: Relaxin decreases renal interstitial fibrosis and slows progression of renal disease. *Kidney Int.* 2001, 59, S. 876–882.
45. Gehring U., Mugele K., and Ulrich J.: Cellular receptor levels and glucocorticoid responsiveness of lymphoma cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1984, 36, S. 107–113.
46. Graham E. F. and Dracy A. E.: The effect of relaxin and mechanical dilatation of the bovine cervix. *J. Dairy Sci.* 1953, 36, S. 772-777.
47. Green B., Leake R. E.: Steroid hormone receptors: Assay and characterization. *Steroid hormones: a practical approach*; IRL Press. 1987, S. 67-98.
48. Gunnarsen J. M., Fu P., Roche P. J. and Tregear G. W.: Expression of human relaxin genes: characterization of a novel alternatively-spliced human relaxin mRNA species. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1996, 118, S. 85-94.
49. Hamolsky M. and Sparrow R. C.: Influence of relaxin on mammary development in sexually immature female rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1945, 60, S. 8-9.
50. Hansell D. J., Bryant-Greenwood G. D. and Greenwood F. C.: Expression of the human relaxin H1 in the decidua, trophoblast, and prostate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1991, 72, S. 899–904.
51. Hisaw F. L.: Experimental relaxation of the pubic ligament of guinea pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1926, 23, S. 661-663.
52. Holm S.: A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat.* 1979, 6, S. 65-70.
53. Hsu S. Y., Nakabayashi K., Nishi S., Kumagai J., Kudo M., Sherwood O. D. et al.: Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science.* 2002, 295, S. 671–674.
54. Hudson P., Haley J., John M., Cronk M., Crawford R., Haralambidis J. et al.: Structure of a genomic clone encoding biologically active human relaxin. *Nature.* 1983, 301, S. 628-631.
55. Hudson P., John M., Crawford R., Haralambidis J., Scanlon D., Gorman J. et al.: Relaxin gene expression in human ovaries and the predicted structure

- of a human prorelaxin by analysis of cDNA clones. *EMBO J.* 1984, 3, S. 2333-2339.
56. Ivell R, Einspanier A.: Relaxin peptides are new global players. *Trends Endocrinol Metab.* 2002, 13, S. 343-8.
57. Jenkins B. D., Pullen C. B., Darimont B. D.: Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocrinol. Metab.* 2001, 12, S. 122-6.
58. Jordan V. C.: Selective estrogen receptor modulation: a personal perspective. *Cancer Res.* 2001, 61, S. 5683-7.
59. Kakouris H., Eddie L. W. and Summers R. J.: Cardiac effects of relaxin in rats. *Lancet.* 1992, 339, S. 1076–1078.
60. Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S.: Nuclear hormonereceptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chem. Biol.* 1996, 3, S. 529-536.
61. Kenyon N. J., Ward R. W., Last J. A.: Airway fibrosis in a mouse model of airway inflammation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003, 186, S. 90–100.
62. Kliewer S. A., Moore J. T., Wade L., Staudinger J. L., Watson M. A., Jones S. A., McKee D. D., Oliver B. B., Willson T. M., Zetterstrom R. H., Perlmann T., Lehmann J. M.: An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell.* 1998, 92, S. 73-82.
63. Kraichely D. M., Sun J., Katzenellenbogen J. A., Katzenellenbogen B. S.: Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta: correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members. *Endocrinology.* 2000, 141, S. 3534-45.
64. Krantz J. C., Bryant H. H. and Carr C. J.: The action of aqueous corpus luteum extract upon uterine activity. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1950, 90, S. 372-375.
65. Kumar R., Thompson E. B.: The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids.* 1999, 64, S. 310–9.

66. Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227, S. 680-685.
67. Link J. T., Sorensen B. K., Patel J., Emery M., Grynfarb M., Goos-Nilsson A.: Discovery of novel nonsteroidal glucocorticoid receptor modulators. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004, 14, S. 2209-12.
68. Loke T. K., Sousa A. R., Corrigan C. J., Lee T. H.: Glucocorticoid-resistant asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2002, 2, S. 144-50.
69. MacLennan A. H. and Grant P.: Human relaxin. In vitro response of human and pig myometrium. *J. Reprod. Med*. 1991, 36, S. 630–634.
70. MacLennan A. H., Grant P. and Bryant-Greenwood G.: hRLX-1. In vitro response of human and pig myometrium. *J. Reprod. Med*. 1995, 40, S. 703–706.
71. MacLennan A. H., Grant P., Ness D. and Down A.: Effect of porcine relaxin and progesterone on rat, pig and human myometrial activity in vitro. *J. Reprod. Med*. 1986, 31, S. 43–49.
72. Marriott D., Gillece-Castro B. and Gorman C. M.: Prohormone convertase-1 will process prorelaxin, a member of the insulin family of hormones. *Mol. Endocrinol*. 1992, 6, S. 1441–1450.
73. Masini E., Bani D., Bigazzi M., Mannaioni P. F. and Bani-Sacchi T.: Effects of relaxin on mast cells. In vitro and in vivo studies in rats and guinea pigs. *J. Clin. Invest*. 1994, 94, S. 1974–1980.
74. Masini E., Salvemini D., Mugnai L., Bello M. G., Bani D. and Mannaioni P. F.: The effect of relaxin on myocardial ischaemia- reperfusion injury and histamine release in vitro and in vivo. *Inflamm. Res*. 1996, 45, S. S27–S28.
75. Novak J., Danielson L. A., Kerchner L. J., Sherwood O. D., Ramirez R. J., Moalli P. A. et al.: Relaxin is essential for renal vasodilation during pregnancy in conscious rats. *J. Clin. Invest*. 2001, 107, S. 1469–1475.
76. O'Byrne K. T., Eltringham L., Clarke G. and Summerlee A. J.: Effects of porcine relaxin on oxytocin release from the neurohypophysis in the anaesthetized lactating rat. *J. Endocrinol*. 1986, 109, S. 393–397.

77. Oakley R. H., Jewell C. M., Yudit M. R., Bofetiado D. M., Cidlowski J. A.: The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, S. 27857-66.
78. Oakley R. H., Sar M., Cidlowski J. A.: The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, S. 9550-9.
79. O'Dell J. R.: Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2004, 350, S. 2591-602.
80. Osborn L., Kunkel S., Nabel G.J.: Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989 Apr; 86, S. 2336-40.
81. Osheroff, P.L. and Phillips, H.S.: Autoradiographic localization of relaxin binding sites in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, 88, S. 6413–6417.
82. Palejwala S., Stein D. S., Weiss G., Monia B. P., Tortoriello D. and Goldsmith L. T.: Relaxin positively regulates matrix metalloproteinase expression in human lower uterine segment fibroblasts using a tyrosine kinase signaling pathway. *Endocrinology.* 2001, 142, S. 3405–3413.
83. Palejwala S., Tseng L., Wojtczuk A., Weiss G., Goldsmith L. T.: Relaxin gene and protein expression and its regulation of procollagenase and vascular endothelial growth factor in human endometrial cells. *Biol Reprod.* 2002, 66, S. 1743-8.
84. Park W. C., Jordan V. C.: Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. *Trends Mol Med.* 2002, 8, S. 82-88.
85. Parry L. J., Potershi R. S., Summerlee A. J. and Jones S. A.: Mechanisms of the haemotensive action of porcine relaxin in anaesthetised rats. *J. Neuroendocrinol.* 1990, 2, S. 53–58.
86. Petersen L. K., Svane D., Uldbjerg N. and Forman A.: Effects of human relaxin on isolated rat and human myometrium and uteroplacental arteries.

- Obstet. Gynecol. 1991, 78, S. 757–762.
87. Piccinni M. P., Bani D., Beloni L., Manuelli C., Mavilia C., Vocioni F. et al.: Relaxin favors the development of activated human T cells into Th1-like effectors. *Eur. J. Immunol.* 1999, 29, S. 2241–2247.
88. Piccinni M. P., Maggi E. and Romagnani S.: Environmental factors favoring the allergen-specific Th2 response in allergic subjects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000, 917, S. 844–852.
89. Piedras-Renteria E. S., Sherwood O. D. and Best P. M.: Effects of relaxin on rat atrial myocytes. II. Increased calcium influx derived from action potential prolongation. *Am. J. Physiol.* 1997a, 272, S. H1798–H1803.
90. Piedras-Renteria E. S., Sherwood O. D. and Best P. M.: Effects of relaxin on rat atrial myocytes. I. Inhibition of I(to) via PKA-dependent phosphorylation. *Am. J. Physiol.* 1997b, 272, S. H1791–H1797.
91. Pujols L., Mullol J., Roca-Ferrer J., Torrego A., Xaubet A., Cidlowski J. A., Picado C.: Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2002, 283, S. C1324-31.
92. Qin X., Garibay-Tupas J., Chua P. K., Cachola L. and Bryant- Greenwood G. D.: An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. I. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase- 1) and tissue plasminogen activator. *Biol. Reprod.* 1997, 56, S. 800–811.
93. Rajapandi T., Greene L. E., Eisenberg E.: The molecular chaperones Hsp90 and Hsc70 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, S. 22597-604.
94. Resche-Rigon M., Gronemeyer H.: Therapeutic potential of selective modulators of nuclear receptor action. *Curr Opin Chem Biol.* 1998, 2, S. 501-7.
95. Riad M., Mogos M., Thangathurai D., Lumb P. D.: Steroids. *Curr Opin Crit Care.* 2002, 8, S. 281-4.
96. Sakbun V., Ali S. M., Greenwood F. C. and Bryant-Greenwood G. D.: Human relaxin in the amnion, chorion, decidua parietalis, basal plate, and pla-

- central trophoblast by immunocytochemistry and northern analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990, *70*, S. 508-514.
97. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1989
98. Sanborn B. M., Kuo H. S., Weisbrodt N. W. and Sherwood O.D.: The interaction of relaxin with the rat uterus. I. Effect on cyclic nucleotide levels and spontaneous contractile activity. *Endocrinology*. 1980, *106*, S. 1210–1215.
99. Sapolsky R. M., Romero L. M., Munck A. U.: How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 2000, *21*, S. 55–89.
100. Scatchard G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1949, *51*, S. 660-672.
101. Schaaf M. J., Cidlowski J. A.: Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2002, *83*, S. 37–48.
102. Schoneveld O. J., Gaemers I. C., Lamers W.H.: Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta*. 2004, *1680*, S. 114-28.
103. Schulz M., Eggert M.: Novel ligands: fine tuning the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor. *Curr Pharm Des.* 2004, *10*, S. 2817-26.
104. Schwabe C., Steinetz B. G., Weiss G., Segaloff A., McDopnald K., O'Byrne E., Hochman J. et al.: Relaxin. *Rec. Prog. Horm. Res.* 1978, *34*, S. 123-199.
105. Seibold J. R., Korn J. H., Simms R., Clements P. J., Moreland L. W., Mayes M. D. et al.: Recombinant human relaxin in the treatment of scleroderma. A randomized, doubleblind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 2000, *132*, S. 871–879.
106. Sekiguchi K., Li X., Coker M., Flesch M., Barger P. M., Sivasubramanian N., Mann D. L.: Cross-regulation between the renin-angiotensin system and inflammatory mediators in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res.* 2004, *63*, S. 433-42.
107. Seppala M, Koistinen H, Koistinen R: Glycodelins. *Trends Endocrinol. Metab.* 2001, *12*, S. 111-117.

108. Sherwood, O.D.: Relaxin. In: The Physiology of Reproduction, 2<sup>nd</sup> Ed. (Knobil, E. and Neill, J.D., eds) Raven Press. 1994, S. 861-1009.
109. Shishehbor M. H., Bhatt D. L.: Inflammation and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2004, 6, S. 131-9.
110. Silva C. M., Powell-Oliver F. E., Jewell C. M., Sar M., Allgood V. E., Cidlowski J. A.: Regulation of the human glucocorticoid receptor by long-term and chronic treatment with glucocorticoid. *Steroids.* 1994, 59, S. 436-42.
111. St. Louis J. and Massicotte G.: Chronic decrease of blood pressure by rat relaxin in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 1985, 37, S. 1351–1357.
112. Stewart D. R., Celniker A. C., Taylor C. A., Cragun J. R., Overstreet J. W. and Lasley B. L.: Relaxin in the periimplantation period. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990, 70, S. 1771-1773.
113. Stewart, D.R. and VandeVoort, C.A.: Relaxin secretion by human granulosa cell culture is predictive of *in vitro* fertilization – embryo transfer success. *Hum. Reprod.* 1999, 14, S. 338–344.
114. Stewart D.R., Overstreet J. W., Celniker A. C., Hess D. L., Cragun J. R., Boyers S. P., Lasley B. L.: *Clin. Endocrinol.* 1993, 38, S. 379–385.
115. Sunder S, Lenton E. A.: Endocrinology of the periimplantation period. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2000, 14, S. 789-800.
116. Tashima L. S., Mazoujian G. and Bryant-Greenwood G. D.: Human relaxins in normal, benign and neoplastic breast tissue. *J. Mol. Endocrinol.* 1994, 12, S. 351-364.
117. Telgmann R. and Gellersen B.: Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene. *Hum. Reprod. Update.* 1998, 4, S. 472–479.
118. Too C. K., Bryant-Greenwood G. D. and Greenwood F. C.: Relaxin increases the release of plasminogen activator, collagenase, and proteoglycanase from rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology.* 1984, 115, S. 1043–1050.
119. Toth M., Taskinen P. and Ruskoaho H.: Relaxin stimulates atrial natriuretic

- peptide secretion in perfused rat heart. *J. Endocrinol.* 1996, *150*, S. 487–495.
120. Umland S. P., Schleimer R. P., Johnston S. L.: Review of the molecular and cellular mechanisms of action of glucocorticoids for use in asthma. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2002, *15*, S. 35-50.
121. Unemori E. N., Beck L. S., Lee W. P., Xu Y., Siegel M., Keller G. et al.: Human relaxin decreases collagen accumulation in vivo in two rodent models of fibrosis. *J. Invest. Dermatol.* 1993, *101*, S. 280–285.
122. Unemori E. N., Erikson M. E., Rocco S. E., Sutherland K. M., Parsell D. A., Mak J. et al.: Relaxin stimulates expression of vascular endothelial growth factor in normal human endometrial cells in vitro and is associated with menometrorrhagia in women. *Hum. Reprod.* 1999, *14*, S. 800–806.
123. Unemori E. N., Lewis M., Constant J., Arnold G., Grove B. H., Normand J. et al.: Relaxin induces vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis selectively at wound sites. *Wound Repair Regen.* 2000, *8*, S. 361–370.
124. Vasilenko P., Mead J. P. and Weidmann J. E.: Uterine growth-promoting effects of relaxin: a morphometric and histological analysis. *Biol. Reprod.* 1986, *35*, S. 987–995.
125. Wallace A. D., Cidlowski J. A.: Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 2001, *276*, S. 42714-21.
126. Wang-Lee J. L., Lenhart J. A., Ohleth K. M., Ryan P. L. and Bagnell C. A.: Regulation of urokinase- and tissue-type plasminogen activator by relaxin in the uterus and cervix of the prepubertal gilt. *J. Reprod. Fertil.* 1998, *114*, S. 119–125.
127. Ward D. G., Thomas G. R. and Cronin M. J.: Relaxin increases rat heart rate by a direct action on the cardiac atrium. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 1992, *186*, S. 999–1005.
128. Webster J. C., Jewell C. M., Bodwell J. E., Munck A., Sar M., Cidlowski J. A.: Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple



- functions of the receptor protein. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, S. 9287-93.
129. Wehling M.: Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol.* 1997, 59, S. 365-93.
130. Weigel N. L., Zhang Y.: Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J Mol Med.* 1998, 76, S. 469-79.
131. Weisinger R. S., Burns P., Eddie L. W. and Wintour E. M.: Relaxin alters the plasma osmolality-arginine vasopressin relationship in the rat. *J. Endocrinol.* 1993, 137, S. 505–510.
132. Wikstrom A. C., Okret S., Bakke O., Fuxe K., Gustafsson J. A.: Glucocorticoid mechanism of action: monoclonal antibodies as experimental tools. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.* 1986, 3, S. 185–196.
133. Winslow J. W., Shih A., Bourell J. H., Weiss G., Reed B., Stults J. T. et al.: Human seminal relaxin is a product of the same gene as human luteal relaxin. *Endocrinology.* 1990, 130, S. 2660–2668.
134. Wolfe F., Michaud K.: Heart failure in rheumatoid arthritis: rates, predictors, and the effect of anti-tumor necrosis factor therapy. *Am J Med.* 2004, 116, S. 305-11.
135. Zhang Q., Liu S. H., Erikson M., Lewis M., Unemori E.: Relaxin activates the MAP kinase pathway in human endometrial stromal cells. *J. Cell. Biochem.* 2002, 85, S. 536–544.

## **8 Danksagung**

Für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und die umfassende Betreuung möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. med. Thomas Dschietzig bedanken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. Gert Baumann und Herrn Prof. Dr. med. Karl Stangl für ihre Unterstützung und die Möglichkeit der Forschung im molekularbiologischen Labor der Medizinischen Klinik m. S. Kardiologie, Pulmologie und Angiologie der Charité.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Henryk Dreger, dessen Anregungen und Tipps ich mir immer sicher sein konnte.

Darüber hinaus danke ich Cornelia Bartsch und Dr. rer. nat. Silke Meiners sowie den übrigen Mitarbeitern des Kardiologischen Forschungslabors, die mir alle stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Für ihre fortwährende Unterstützung möchte ich meinen Eltern danken.

## 9 Lebenslauf

<b>Name</b>	Michael Greinwald
<b>Geburtsdatum, -ort</b>	10.08.1976, Toronto/Kanada
<b>Familienstand</b>	ledig
07/1995	Abitur Käthe-Kollwitz-Gymnasium, Hannover
09/1995 – 10/1996	Ausbildung zum Rettungshelfer im Rahmen des Zivildienstes DRK, Hannover
10/1996 – 05/2004	Studium der Humanmedizin Charité – Universitätsmedizin Berlin Humboldt-Universität
09/2001 – 04/2003	experimenteller Teil der Promotion Molekularbiologisches Forschungslabor, Kardiologie, Charité, gefördert durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsförderung
04/2003 – 03/2004	Praktisches Jahr Anästhesie und Intensivmedizin, Unfallkrankenhaus, Berlin  Innere Medizin Bürgerspital, St. Gallen, Schweiz  Chirurgie Leighton Hospital, Crewe, England
06/2004 – 10/2004	Abschluss der Promotion
seit 11/2004	Assistenzarzt Klinik für Kardiologie Kreiskrankenhaus „an der Weser“, Hameln

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die hier vorliegende Arbeit von mir selbst ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die verwendeten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 29. Mai 2006